

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



17 FEB 2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

102 47 599.7

REC'D 02 OCT 2003

WIPO PCT

**Anmeldetag:**

11. Oktober 2002

**Anmelder/Inhaber:**

SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

**Bezeichnung:**

Transgene Expressionskassetten zur Expression  
von Nukleinsäuren in der pflanzlichen Blüte

**IPC:**

C 12 N 15/82

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. Juli 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust

**BEST AVAILABLE COPY**

## Patentansprüche

1. Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen  
5 in der in der pflanzlichen Blüte, wobei nachfolgende Schritte umfasst sind
- I. Einbringen einer transgenen Expressionskassette in  
10 pflanzliche Zellen, wobei die transgene Expressionskassette mindestens nachfolgende Elemente enthält
- a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend  
für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und
- 15 b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,  
wobei mindestens eine der besagten Promotorsequenzen und  
20 eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz oder die pflanzliche Zelle heterolog ist, und
- 25 II. Auswahl von transgenen Zellen, die besagte Expressionskassette stabil in das Genom integriert enthalten, und
- III. Regeneration von vollständigen Pflanzen aus besagten  
transgenen Zellen, wobei mindestens eine der weiteren  
30 Nukleinsäuresequenz in der Blüte exprimiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Promotorsequenz eines  
Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz ausgewählt  
ist aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus
- 35 i) der Promotorsequenz der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* gemäß SEQ ID NO: 7, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa* gemäß SEQ ID NO: 8, und
- 40 ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 und
- 45

## 2

iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

5

3. Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodieren, wobei bei der Identifikation und/oder Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.

10

15 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 45 umfasst.

20

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, wobei das Verfahren unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird und die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.

25

6. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte, umfassend nachfolgende Schritte:

30

I. Isolation einer Promotorsequenz, wobei bei der Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.

35

II. Funktionelle Verknüpfung besagter Promotorsequenz mit einer weiteren Nukleinsäuresequenz, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf den Promotor heterolog ist.

40

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 45 umfasst.

45

## 3

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, wobei das Verfahren unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird und die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.

5

9. Transgene Expressionskassette zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte, umfassend

- 10 a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und

- b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und

- 15 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz heterolog ist.

20

10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 9, wobei die Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz ist ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus

25

- i) der Promotorsequenz der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* gemäß SEQ ID NO: 7, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa* gemäß

30

SEQ ID NO: 7, und

- ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß

35

SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 und

- iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß

40

SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

45



11. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 9 oder 10, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz

- 5 a) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, oder
- b) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense-RNA, anti-sense-RNA oder doppelsträngigen RNA

10

ermöglicht.

12. Isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend

- 15 a) den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 oder
- b) ein funktionell äquivalentes Fragment von a) mit im wesentlichen der gleiche Promotoraktivität wie a).

20

13. Isolierte Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 12, umfassend in 3'-Orientierung zu dem Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 oder einem funktionell äquivalenten Fragment der vorgenannten, eine Sequenz kodierend für eine 5'-untranslatierte Region und/oder ein Tranistpeptid.

25

14. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 12 oder 13 umfassend eine Sequenz beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder 3.

30 15. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und

35

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementären ist.

40

16. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 15, wobei der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz umfasst ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

45

## 17. Ribonukleinsäuremolekül umfassend

- 5 a) mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und
- 10 b) mindestens eine weitere Ribonukleotidsequenz, die zu mindestens einem Teil der Ribonukleotidsequenz unter a) im wesentlichen komplementären ist,

wobei a) und b) kovalent miteinander verbunden sind und zwischen a) und b) gegebenenfalls weitere Funktionselemente lokalisiert sein können.

15

18. Ribonukleinsäuremolekül nach Anspruch 17, wobei der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz umfasst ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

## 20 19. Transgene Expressionskassette, umfassend

- a) mindestens einen in Pflanzen funktionellen Promotor, und
- 25 b) mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 15 oder 16 oder kodierend für ein Ribonukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18,

30 wobei mindestens einer der besagten Promotor und mindestens eine der besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell miteinander verknüpft sind und der Promotor in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

- 35 20. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 19, wobei der Promotor ein Promotor mit Spezifität für die pflanzliche Blüte ist.

- 40 21. Transgener Expressionvektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 oder eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20.

- 45 22. Transgener Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, eine doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, eine Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18, eine transgene Expressionskassette gemäß

## 6

einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 21.

23. Transgener Organismus nach Anspruch 23 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen und pflanzlichen Organismen.
24. Transgener Organismus nach Anspruch 22 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, nicht-menschlichen tierischen und pflanzlichen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut.
25. Transgener Organismus nach Anspruch 23 oder 24 ausgewählt aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.
26. Verwendung einer isolierten Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, einer doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, einer Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18, einer transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20, eines transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 21 oder eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25 oder von diesem abgeleiteter Zellkulturen, Teile, Organe, Gewebe oder transgenes Vermehrungsgut in Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuren oder Proteinen.
27. Verwendung einer isolierten Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, einer doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, einer Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18, einer transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20, eines transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 21 oder eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25 oder von diesem abgeleiteter Zellkulturen, Teile, Organe, Gewebe oder transgenes Vermehrungsgut zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.
28. Verfahren zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wobei ein transgener Organismen nach einem der Ansprüche 23 bis 25 gezüchtet wird und das gewünschte Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutikum oder Feinchemikalie unter Verwendung des besagten Organismus hergestellt und/oder isoliert wird.

7

29. Verfahren zur Herstellung von Ketarotinoiden, wobei die mRNA-Menge und/oder Aktivität mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase vermindert wird durch Einbringen mindestens einer doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, einer Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18 oder einer transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 19 oder 20.

10

15

20

25

30

35

40

45

Transgene Expressionskassetten zur Expression von Nukleinsäuren  
in der pflanzlichen Blüte

## 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte, sowie transgene Expressionskassetten und Expressionsvektoren, 10 die Promotoren mit einer Expressionsspezifität für die pflanzliche Blüte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen transgenen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren transformierte Organismen (bevorzugt Pflanzen), davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung der- 15 selben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel 20 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika (Dunwell JM (2000) J Exp Bot 51 Spec No:487-96). Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene ist die Bereitstellung von in Pflanzen 25 funktionellen Promotoren. Promotoren sind wichtige Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie, um die Expression bestimmter Gene in einer transgenen Pflanze zu steuern und so bestimmte Wesensmerkmale der Pflanze zu erzielen.

30 Verschiedene in Pflanzen funktionelle Promotoren sind bekannt, zum Beispiel konstitutive Promotoren wie der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobakterium, der TR-Doppelpromotor oder der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812). Nachteilig bei diesen 35 Promotoren ist, dass sie in fast allen Geweben der Pflanze konstitutiv aktiv sind. Eine gezielte Expression von Genen in bestimmten Pflanzenteilen oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten ist mit diesen Promotoren nicht möglich. Besonders groß ist daher der Bedarf an Promotoren mit einem definierten Aktivitätsprofil und einer Spezifität für bestimmte pflanzliche Gewebe. 40

Beschrieben sind Promotoren mit Spezifitäten für verschiedene pflanzliche Gewebe wie Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen. Die Stringenz der Spezifität, als auch die Expressionsaktivität dieser Promotoren ist sehr 45 unterschiedlich.

## 2

Die pflanzliche Blüte dient der geschlechtlichen Fortpflanzung der Samenpflanzen. Pflanzliche Blüten - vor allem die Blütenblätter (Petalen) - akkumulieren häufig große Mengen sekundärer Pflanzenstoffe, wie beispielsweise Terpene, Anthocyane, Carotinoide, Alkaloide und Phenylpropanoide, die der Blüte als Duftstoffe, Abwehrstoffe oder als Farbstoffe dienen. Viele dieser Substanzen sind von ökonomischem Interesse. Zudem ist die Blütenknospe und die Blüte der Pflanze ein empfindliches Organ, besonders gegen Stressfaktoren wie Kälte.

10

Blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoensynthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der Promotor des APETALA3 Gens (Hill TA et al. (1998) Development 125:1711-1721) sind bekannt. Diese Promotoren

15 weisen jedoch alle einen oder mehrere Nachteile auf, die eine breite Nutzung beeinträchtigen:

1) Sie sind innerhalb der Blüte spezifisch für ein oder mehrere Blütengewebe und gewährleisten nicht die Expression in allen Geweben der Blüte.

20

2 Sie sind - wie im Beispiel des an der Blütenentwicklung beteiligten APETALA3 Gens - während der Blütenentwicklung stark reguliert und nicht zu allen Phasen der Blütenentwicklung aktiv.

25

3) Sie zeigen mitunter starke Nebenaktivitäten in anderen pflanzlichen Geweben.

30 Trotz der Vielzahl bekannter pflanzlicher Promotoren, besteht ein Bedarf an Promotoren mit einer Spezifität für die pflanzliche Blüte, die über einen langen Zeitraum der Blütenentwicklung und Blüte eine hohe Expression gewährleisten.

35 Es bestand daher die Aufgabe, Verfahren und geeignete Promotoren für die gezielte, transgene Expression von Nukleinsäuren in den Blütengeweben bereitzustellen. Diese Aufgabe wurde durch Bereitstellung von Promotoren der  $\epsilon$ -Cyclase gelöst. Diese Promotoren zeigen eine ungewöhnliche starke Expression in zahlreichen

40 Blütenorganen.

## 3

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der in der pflanzlichen Blüte, wobei nachfolgende Schritte umfasst sind

5

I. Einbringen einer transgenen Expressionskassette in pflanzliche Zellen, wobei die transgene Expressionskassette mindestens nachfolgende Elemente enthält

10 a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und

b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und

15 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine der besagten Promotorsequenzen und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die

20 Promotorsequenz oder die pflanzliche Zelle heterolog ist, und

II. Auswahl von transgenen Zellen, die besagte Expressionskassette stabil in das Genom integriert enthalten, und

25 III. Regeneration von vollständigen Pflanzen aus besagten transgenen Zellen, wobei mindestens eine der weiteren Nukleinsäuresequenz in der Blüte exprimiert wird.

Ein weiterer Gegenstand betrifft transgene Expressionskassetten, wie sie z.B. in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommen können. Bevorzugt umfassen die transgenen Expressionskassetten zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte,

35 a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und

b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und

40 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz

45 heterolog ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten meint "Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase" eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus

5

- i) der Promotorsequenz der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* gemäß SEQ ID NO: 7, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa* gemäß SEQ ID NO: 8, und

10

- ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 und

15

- iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

- 20 Besonders bevorzugt meint "Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase" die Promotorsequenz aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 und funktionell äquivalente Fragmente derselben.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können weiteren

- 25 genetischen Kontrollsequenzen und/oder zusätzliche Funktionselemente enthalten.

Bevorzugt können die transgenen Expressionskassetten durch die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz die Expression

- 30 eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, und/oder die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense-RNA, anti-sense-RNA oder doppelsträngigen RNA ermöglichen.

- 35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgener Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Expressionskassette enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene

- 40 Organismen, die eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren enthalten. Der Organismus kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, nicht-menschlichen tierischen und pflanzlichen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe,
- 45 Organe oder Vermehrungsgut, bevorzugt ist der Organismus ausgewählt aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.



## 5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher eine isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 sowie funktionell äquivalente Fragmente derselben.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. die erfindungsgemäße transgenen Expressionskassette in Form einer funktionell äquivalenten Promotorsequenz neben der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 zudem noch  
10 die Sequenz kodierend für die 5'-untranslatierte Region des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens aus *Tagetes erecta*. Besonders bevorzugt ist die durch SEQ ID NO: 2 beschriebene Sequenz.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst die  
15 erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. die erfindungsgemäße transgenen Expressionskassette in Form einer funktionell äquivalenten Promotorsequenz neben der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 zudem noch die Sequenz kodierend für die 5'-untranslatierte Region des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens aus *Tagetes erecta* und eine Sequenz kodierend  
20 für ein Transitpeptid, bevorzugt für das Transitpeptid des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 4. Bevorzugt ist diese Sequenz in 3'-Richtung in Bezug auf einen der erfindungsgemäßen Promotoren orientiert. Als Promotorsequenz in diesem Zusammenhang besonders bevorzugt ist die durch  
25 SEQ ID NO: 3 beschriebene Sequenz.

Ein weiterer Gegenstand betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen, transgenen Expressionsvektoren oder transgenen Organismen zur transgenen Expression von  
30 Nukleinsäuren und/oder Proteinen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz zur Verminderung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase. In diesem Rahmen sind Expressions-  
35 kassetten erfindungsgemäß umfasst, die eine zu der Promotorsequenz korrespondierende doppelsträngige RNA zu exprimieren vermögen.

Insbesondere bevorzugt ist die Verwendung der besagten trans-  
40 genen Organismen oder von diesem abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wobei die Feinchemikalien bevorzugt Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fett-  
45 säuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe sind. Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Herstellung besagter Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut,

## 6

Pharmazeutika oder Feinchemikalien unter Einsatz der erfindungsgemäßen transgenen Organismen oder von diesen abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut.

5

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten sind aus nachfolgendem Grund besonders vorteilhaft:

- 10 a) Sie gewähren eine selektive Expression in der Blüte von Pflanze und ermöglichen zahlreiche Anwendungen, wie beispielsweise eine Resistenz gegen Stressfaktoren wie Kälte oder eine gezielte Synthese von sekundären Pflanzenstoffen. Die Expression erfolgt über den gesamten Entwicklungszeitraum der Blüte mit hoher Aktivität.

15

"Expression" meint die Transkription der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, kann aber - im Falle eines offenen Leserahmens in "sense"-Orientierung - auch die Translation der transkribierten RNA der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz  
20 in ein korrespondierendes Polypeptid mit einschließen.

"Transgen" meint - beispielsweise in Bezug auf eine transgene Expressionskassette, einen transgenen Expressionsvektor, einen transgenen Organismus oder Verfahren zur transgenen Expression  
25 von Nukleinsäuren - alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene Konstruktionen oder Verfahren unter Verwendung derselben, in denen entweder

- 30 a) ein  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor (z.B. gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten, oder
- b) die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor gemäß a), oder
- 35 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei  
40 die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Bevorzugt ist die in den Expressionskassetten enthaltene erfindungsgemäße Promotorsequenz (z.B. die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) heterolog in Bezug auf die  
45 mit ihr funktionell verknüpfte, transgen zu exprimierende weitere Nukleinsäuresequenz. "Heterolog" meint in diesem Zusammenhang, dass die weitere Nukleinsäuresequenz nicht für das Gen kodiert,

das natürlicherweise unter der Kontrolle des besagten Promotors steht.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromo-  
5 somalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in  
einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Biblio-  
thek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäure-  
sequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung  
flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und  
10 hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens  
500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders  
bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommendes  
Expressionskonstrukt - beispielsweise die natürlich vorkommende  
Kombination des Promotors gemäß SEQ ID NO: 1 und eines Gens  
15 kodierend für ein Protein gemäß SEQ ID NO: 10 oder 12 wird zu  
einem transgenen Expressionskonstrukt, wenn diese durch nicht-  
natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispiels-  
weise einer in vitro Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende  
Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch  
20 oben).

"Transgen" meint in Bezug auf eine Expression ("transgene  
Expression") bevorzugt all solche unter Einsatz einer transgenen  
Expressionskassette, transgenen Expressionsvektor oder transgenen  
25 Organismus - entsprechend dem oben gegebenen Definitionen -  
realisierten Expressionen.

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten, die  
von ihnen abgeleitete transgenen Expressionsvektoren und trans-  
30 genen Organismen können funktionelle Äquivalente zu den unter  
SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenz  
umfassen.

Funktionelle Äquivalente umfasst auch all die Sequenzen, die von  
35 dem komplementären Gegenstrang der durch SEQ ID NO: 1, 7 oder  
8 definierten Sequenzen abgeleitet sind und im wesentlichen die  
gleiche Promotoraktivität aufweisen. Besonders bevorzugt sind  
die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2 oder 3 umfasst, die neben der  
Promotorsequenz die 5'-untranslatierte Region bzw. die 5'-un-  
40 translatierte Region und die Region kodierend für das Transit-  
peptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* enthalten.

Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder  
künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrie-  
45 benen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenz sowie deren Homologen aus anderen  
Pflanzengattungen und -arten, welche weiterhin im wesentlichen

## 8

die gleiche Promotoraktivität wie der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 aufweisen.

Eine Promotoraktivität wird im wesentlichen als gleich bezeichnet, wenn die Transkription eines bestimmten zu exprimierenden Gens unter Kontrolle von z.B. eines funktionellen Äquivalentes der durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenz oder eines funktionell äquivalenten Fragmentes derselben - unter ansonsten unveränderten Bedingungen - in mindestens einem Blüten-Gewebe höher ist als in einem anderen Nicht-Blüten Gewebe, beispielsweise der Wurzel oder den Blättern. Dabei beträgt die Expression unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren in einem Blüten-Gewebe bevorzugt mindestens das doppelte oder das fünffache, ganz besonders bevorzugt mindestens das zehnfache oder das fünfzigfache, am meisten bevorzugt mindestens das hundertfache als in einem anderen Nicht-Blüten Gewebe, beispielsweise der Wurzel oder den Blättern.

"Blüte" meint allgemein einen Spross begrenzten Wachstums, dessen Blätter zu Fortpflanzungsorganen umgewandelt sind. Die Blüte besteht aus verschiedenen "Blütengeweben" wie z.B. den Kelchblätter (Sepalen), den Kronblätter (Petalen), den Staubblätter (oder Staubgefäßen; Stamina) oder den Fruchtblätter (Karpellen). Als Androeceum wird in der Blüte die Gesamtheit der Staubblätter (Stamina) bezeichnet. Die Staubblätter befinden sich innerhalb des Petalen- bzw. Sepalenkreises. Ein Staubblatt gliedert sich in ein Filament und eine am Ende sitzende Anthere. Diese wiederum unterteilt sich in zwei Theken, welche durch ein Konnektiv miteinander verbunden sind. Jede Theke besteht aus je zwei Pollensäcken, in denen der Pollen gebildet wird.

"Gezielt" meint in Bezug auf die Expression in der pflanzlichen Blüten bevorzugt, dass die Expression unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren in mindestens einem pflanzlichen Blütengewebe mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das fünfzigfache, ganz besonders bevorzugt bevorzugt mindestens das hundertfache beträgt als in einem Nicht-Blütengewebe wie beispielsweise den Blättern.

Bevorzugt werden im Rahmen der Ermittlung der Expressionshöhe solche Sequenzen eingesetzt, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporterproteine (Schenborn E, Groskreutz D. (1999) Mol Biotechnol 13(1): 29-44) wie "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques 23(5):912-8), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414),  $\beta$ -Glucuronidase

oder  $\beta$ -Galactosidase. Ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

- "Ansonsten unveränderte Bedingungen" bedeutet, dass die
- 5 Expression, die durch eine der zu vergleichenden transgenen Expressionskassetten initiiert wird, nicht durch Kombination mit zusätzlichen genetischen Kontrollsequenzen, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, modifiziert wird. Unveränderte Bedingungen bedeutet ferner, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise
- 10 Pflanzenart, Entwicklungsstadium der Pflanzen, Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate etc.) zwischen den zu vergleichenden Expressionen identisch gehalten werden.
- 15 Funktionelle Äquivalente zu dem  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 umfasst bevorzugt solche Sequenzen die
- a) im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 aufweisen und
- 20 b) die eine Homologie aufweisen von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz des der  $\epsilon$ -Cyclase-
- 25 Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8, wobei sich die Homologie über eine Länge von mindestens 100 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 200 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 300 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 400 Basenpaaren, am meisten bevorzugt von
- 30 mindestens 500 Basenpaaren erstreckt.
- Dabei kann die Expressionshöhe der funktionellen Äquivalente sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Vergleichswert abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen,
- 35 deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten mit denen durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen
- 40 Promotoren unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders
- 45 bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten mit dem durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotor übersteigt.

## 10

Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Expressionsvektoren zum Einsatz kommenden funktionell äquivalenten Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, wie beispielsweise Arabidopsis thaliana, Brassica napus, Nicotiana tabacum, Solanum tuberosum, Helianthium annuus, Linum sativum oder Oryza sativa durch Homologievergleiche in Datenbanken leicht auffinden. Bevorzugt kann man dazu von den kodierenden Regionen des Gens ausgehen, dessen Promotor durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrieben ist. Ausgehend von beispielsweise den cDNA Sequenzen dieser Gene beschrieben durch SEQ ID NO: 9, 11, 13 oder 15 oder den davon abgeleiteten Proteinsequenz beschrieben durch SEQ ID NO: 10, 12, 14 oder 16 können die entsprechenden homologen Gene - und damit die zugehörigen Promotorregionen - in anderen Pflanzenarten durch Durchmusterung von Datenbanken oder Genbanken (unter Verwendung von entsprechenden Gensonden) leicht in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

20 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfassen funktionelle Äquivalente zu dem  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 solche Sequenzen, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodiert.

25  $\epsilon$ -Cyclase meint allgemein all solche Proteine, die eine  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase verstanden.

Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.

35 Insbesondere meint  $\epsilon$ -Cyclase allgemein all solche Proteine, die befähigt sind, die Ringbildung von Lycopin zu  $\delta$ -Carotin (und gegebenenfalls weiter zu  $\epsilon$ -Carotin) und/oder von Neurosporen zu  $\alpha$ -Zeacarotin zu katalysieren. Bevorzugt hat die  $\epsilon$ -Cyclase eine Oxidoreduktase-Aktivität und/oder zeigt natürlicherweise eine überwiegende Lokalisation in den Plastiden insbesondere den Chloroplasten und Chromoplasten.

Bevorzugt wird unter einer  $\epsilon$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln. Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in

## 11

einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

- Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

- Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen, erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Arch Biochem Biophys 346(1) (1997) 53-64): Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0,25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0,25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0,2 mM NADP<sup>+</sup>, 0,2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0,01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.
- Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem Biophys Res Comm 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (J Biol Chem 266(26) (1991) 17072-17078).
- In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen funktionelle Äquivalente des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase mit einer Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 % zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 10, 12, 14 oder 16 kodieren, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomischen Sequenz darstellen.

## 12

Besonders bevorzugt umfassen funktionelle Äquivalente des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 % zu der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 9, 11, 13 oder 15 hat, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomischen Sequenz darstellen und die cDNA für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodiert.

Bevorzugt sind Promotoren, die einen Sequenzbereich von mindestens 250 Basenpaare, bevorzugt mindestens 500 Basenpaare, besonders bevorzugt 1000 Basenpaare, am meisten bevorzugt mindestens 2000 Basenpaare in 5'-Richtung gerechnet vom ATG-Startkodon der besagten genomischen Sequenzen umfassen.

Besonders bevorzugt sind funktionelle Äquivalente des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodiert, die mindestens eines der nachfolgenden Sequenzmotive enthält:

25

- |    |                               |                 |
|----|-------------------------------|-----------------|
| 1. | G(G/C)GPAGL(A/S)(V/L)A        | (SEQ ID NO: 17) |
| 2. | (L/I)(N/G/S)RXYG(K/R)(V/L)    | (SEQ ID NO: 18) |
| 3. | MVFMD(Y/W)RD                  | (SEQ ID NO: 19) |
| 4. | PTFLY(A/V)M(P/A)              | (SEQ ID NO: 20) |
| 30 | 5. AXMVHP(S/A)TGY(M/S)V(A/V)R | (SEQ ID NO: 21) |
|    | 6. LWPXER(R/K)RQRXFF          | (SEQ ID NO: 22) |

Ganz besonders bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche für ein Protein kodiert, wobei besagtes Protein mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

- |    |    |   |
|----|----|---|
| 40 | 1. | die homologe Sequenz (H1) aus <i>Lactuca sativa</i> gemäß SEQ ID NO: 24,                      |
|    | 2. | die homologen Sequenzen (H2 und H3) aus <i>Adonis palaestina</i> gemäß SEQ ID NO: 26 oder 28, |
|    | 3. | die homologen Sequenz (H4) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> gemäß SEQ ID NO: 30                |
| 45 | 4. | die homologe Sequenzen (H5 und H6) aus <i>Citrus x paradisi</i> gemäß SEQ ID NO: 32 oder 34   |



## 13

5. die homologe Sequenz (H7) aus Citrus sinensis gemäß  
SEQ ID NO: 36
6. die homologe Sequenz (H8) aus Spinacea oleracea gemäß  
SEQ ID NO: 38
- 5 7. die homologe Sequenz (H9) aus Solanum tuberosum gemäß  
SEQ ID NO: 40
8. die homologen Sequenzen (H10 und H11) aus Daucus carota gemäß  
SEQ ID NO: 42 oder 44
9. die homologe Sequenz (H12) aus Tomate gemäß SEQ ID NO: 46

## 10

Am meisten bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche

15 für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

1. die homologe Sequenz (H1) aus Lactuca sativa gemäß  
SEQ ID NO: 23,
- 20 2. die homologen Sequenzen (H2 und H3) aus Adonis palaestina  
gemäß SEQ ID NO: 25 oder 27,
3. die homologen Sequenzen (H4) aus Arabidopsis thaliana gemäß  
SEQ ID NO: 29
4. die homologe Sequenzen (H5 und H6) aus Citrus x paradisi  
gemäß SEQ ID NO: 31 oder 33
- 25 7. die homologe Sequenz (H7) aus Citrus sinensis gemäß  
SEQ ID NO: 35
5. die homologe Sequenz (H8) aus Spinacea oleracea gemäß  
SEQ ID NO: 37
- 30 6. die homologe Sequenz (H9) aus Solanum tuberosum gemäß  
SEQ ID NO: 39
8. die homologen Sequenzen (H10 und H11) aus Daucus carota gemäß  
SEQ ID NO: 41 oder 43
9. die homologe Sequenz (H12) aus Tomate gemäß SEQ ID NO: 45

## 35

Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Expressionsvektoren zum Einsatz kommenden funktionell äquivalenten Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische

- 40 Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, wie beispielsweise Arabidopsis thaliana, Brassica napus, Oryza sativa, Nicotiana tabacum, Solanum tuberosum, Helianthium annuus, Linum sativum durch Homologievergleiche in Datenbanken leicht auffinden.

- 45 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz oder eines Teils derselben in Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren

## 14

von Genen, die für besagte Nukleinsäuresequenz kodieren, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens ein Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine für diese Sequenzmotive angegebene Variation 5 umfasst. Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 oder 46. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 10 45. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen.

Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Identifikation 15 und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für einen Promotor mit Spezifität für die pflanzliche Blüte kodieren, wobei bei der Identifikation und/oder Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen 20 kodiert, die mindestens ein Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine für diese Sequenzmotive angegebene Variation umfasst. Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 oder 46. 25 Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 45. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen. In einer Bevorzugten Ausführungsform basiert das 30 erfindungsgemäße Verfahren auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.

35 Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, um ausgehend von einer Nukleinsäuresequenz (z.B. einem Gentranskript wie beispielsweise einer cDNA) den Promotor des entsprechenden Genes zu identifizieren und zu isolieren. Dazu stehen beispielsweise prinzipiell alle Methoden zur Amplifikation flankierender 40 chromosomaler Sequenzen zur Verfügung. Die beiden am häufigsten genutzten Verfahren sind die inverse PCR ("iPCR"; schematisch dargestellt in Fig. 13) und die "Thermal Asymmetric Interlaced PCR" ("TAIL PCR"). Geeignet ist ferner auch das Verfahren des "PCR Walkings" (Devic et al. (1997) Plant Physiol Biochem 45 35:331-339).

## 15

Für die "iPCR" wird genomische DNA des Organismus, aus dem der funktionell äquivalente Promotor zu isolieren ist, mit einem gegebenen Restriktionsenzym komplett verdaut und anschließend werden in einem verdünnten Ansatz die einzelnen Fragmente rück-  
5 ligiert, also mit sich selbst zu einem ringförmigen Molekül verbunden. In der Vielzahl entstehender ringförmiger DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die die bekannte Sequenz (beispielsweise die Sequenz kodierend für das homologe Protein) enthalten. Ausgehend davon kann das ringförmige Molekül mittels PCR amplifi-  
10 ziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem beide Primer sich an den bekannten Sequenzabschnitt anlagern können. Eine Ausführungsmöglichkeit für die "iPCR" ist beispielhaft in Beispiel 2 wiedergegeben.

15 Die "TAIL-PCR" beruht auf der Verwendung von einerseits einem Satz sukzessive verkürzter hochspezifischer Primer, die sich an die bekannte genomische Sequenz (beispielsweise die Sequenz kodierend für das homologe Protein) anlagern, und andererseits einem Satz kürzerer Zufallsprimer mit geringer Schmelztemperatur,  
20 so dass eine sequenzunspezifischere Anlagerung an die bekannte genomische Sequenz flankierende genomische DNA erfolgt. Die Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende DNA kann mit einer solchen Primerkombination so gestaltet werden, dass eine spezifische Amplifikation der gewünschten Zielsequenz möglich  
25 wird. Eine Ausführungsmöglichkeit für die "TAIL-PCR" ist beispielhaft in Beispiel 2 wiedergegeben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für  
30 die pflanzliche Blüten, umfassend nachfolgende Schritte:

- I. Isolation einer Promotorsequenz, wobei bei der Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine  
35 Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens ein Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine für diese Sequenzmotive angegebene Variation umfasst.
- II. Funktionelle Verknüpfung besagter Promotorsequenz mit einer  
40 weiteren Nukleinsäuresequenz, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf den Promotor heterolog ist.

Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 24, 26,  
45 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 oder 46. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder

## 16

45. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen. In einer bevorzugten Ausführungsform basiert das erfindungsgemäße

- 5 Verfahren auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird. Im Rahmen der funktionellen Verknüpfung können dem Fachmann bekannte Verfahren wie z.B. Ligation etc. eingesetzt werden (s.u.).

10

Die Expressionshöhe eines funktionell äquivalenten Promotors kann sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der

- 15 transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten mit denen durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotoren unterscheidet. Besonders bevorzugt sind

- 20 solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten mit dem durch

- 25 SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotor übersteigt. Bevorzugt ist als Vergleichswert die Expressionshöhe der natürlicherweise von dem Promotor exprimierten mRNAs einer  $\epsilon$ -Cyclase oder des daraus resultierenden Proteins. Bevorzugt ist ferner als Vergleichswert die Expressionshöhe erhalten mit einer beliebigen,

- 30 aber bestimmten Nukleinsäuresequenz, bevorzugt solchen Nukleinsäuresequenzen, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E & Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996)

- 35 Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414) oder die  $\beta$ -Glucuronidase, ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

40

Funktionelle Äquivalente umfassen auch natürliche oder künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotorsequenz. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversionen oder Insertionen eines oder mehrerer

- 45 Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors gemäß SEQ ID NO: 1,

## 17

7 oder 8 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen Sequenz oder z.B. auch das Einfügen oder Entfernen von Restriktionsendonukleaseschnittstellen, die Entfernung überflüssiger DNA oder das Hinzufügen weiterer 5 Sequenzen, zum Beispiel weiterer regulatorischer Sequenzen, sein.

Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B. Transitionen und Transversionen, in Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", 10 Restriktion oder Ligation verwendet werden. Transition meint einen Basenpaaraustausch eines Purin/Pyrimidin-Paares in ein anderes Purin/Pyrimidin-Paar (z.B. A-T gegen G-C). Transversion meint einen Basenpaaraustausch eines Purin/Pyrimidin-Paares gegen ein Pyrimidin/Purin-Paar (z.B. A-T gegen T-A). Deletion meint die 15 Entfernung eines oder mehrerer Basenpaare. Insertion meint die Einführung eines oder mehrerer Basenpaare.

Durch Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "blunt ends" können komplementäre 20 Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. Zu analogen Ergebnissen kann man auch unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer kommen.

25 Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung 30 folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

35

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programm- 40 algorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver- 45 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin,

## 18

Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

5

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 60 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 10 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 10 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 60 % aufweist.

Funktionelle Äquivalente meint ferner DNA Sequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz kodierend für den  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 oder der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und die im wesentlichen gleichen Promotoreigenschaften haben. Der Begriff der Standardhybridisierungsbedingungen ist breit zu verstehen und meint sowohl stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschruttes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschruttes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschruttes sind infolge gegeben:

## 19

## (1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

- a) 4X SSC bei 65°C, oder
- 5 b) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 65°C, oder
- c) 4X SSC, 50 % Formamid, bei 42°C, oder
- d) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung), oder
- 10 e) 2X oder 4X SSC, 30 bis 40 % Formamid bei 42°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 6x SSC bei 45°C, oder,
- g) 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 2 mM EDTA, 1 % BSA und 7 % SDS.

## 15 (2) Waschschritte mit zum Beispiel

- a) 0,1X SSC bei 65°C, oder
- b) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C, oder
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- 20 d) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C, oder
- e) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 1 % SDS, 2 mM EDTA.

Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer funktioneller Äqui-  
25 valente umfassen bevorzugt die Einführung von Mutationen in den  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8. Eine Mutagenese kann ungerichtet ("random") erfolgen, wobei die mutagenisierten Sequenzen anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften nach einer "trial-and-error" Prozedur durchmüstert werden. Besonders vor-  
30 teilhafte Selektionskriterien umfassen beispielsweise die Höhe der resultierenden Expression der eingeführten Nukleinsäuresequenz in einem Blüten-Gewebe.

Verfahren zur Mutagenisierung von Nukleinsäuresequenzen sind dem  
35 Fachmann bekannt und schließen beispielhaft die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer oder mehr Mutationen im Vergleich zu der zu mutierenden Region ein (z.B. im Rahmen einer "Site-specific mutagenesis"). Typischerweise kommen Primer mit ungefähr 15 bis ungefähr 75 Nukleotiden oder mehr zum Einsatz, wobei  
40 bevorzugt ca. 10 bis ca. 25 oder mehr Nukleotidreste an beiden Seiten der zu verändernden Sequenz lokalisiert sind. Details und Durchführung besagter Mutageneseverfahren sind dem Fachmann geläufig (Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol 154:367-382; Tomic et al. (1990) Nucl Acids Res 12:1656; Upender et al. (1995)  
45 Biotechniques 18(1):29-30; US 4,237,224). Eine Mutagenese kann auch durch Behandlung von beispielsweise transgenen Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen

## 20

enthalten, mit mutagenisierenden Agentien wie Hydroxylamin realisiert werden.

Alternativ können nicht-essentielle Sequenzen eines erfindungs-  
5 gemäßen Promotors deletiert werden, ohne die genannten wesentlichen Eigenschaften signifikant zu beeinträchtigen. Derartige Deletionsvarianten stellen funktionell äquivalente Fragmente zu den Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 oder zu funktionellen Äquivalentes derselben dar. Die Eingrenzung  
10 der Promotorsequenz auf bestimmte, essentielle regulatorische Regionen kann z.B. mit Hilfe von Suchroutine zur Suche von Promotorelementen vorgenommen werden. Oft sind in den für die Promotoraktivität relevanten Regionen bestimmte Promotorelemente gehäuft vorhanden. Diese Analyse kann beispielsweise  
15 mit Computerprogrammen wie dem Programm PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements"; Higo K et al. (1999) Nucl Acids Res 27(1): 297-300), der BIOBASE Datenbank "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig; Wingender E et al. (2001) Nucleic Acids Res 29(1):281-3) oder Datenbank PlantCARE (Lescot M et al.  
20 (2002) Nucleic Acids Res 30(1):325-7) vorgenommen werden.

Bevorzugt umfassen die funktionell äquivalenten Fragmente eines der erfindungsgemäßen Promotoren - beispielsweise der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 - mindestens  
25 200 Basenpaar, ganz besonders bevorzugt mindestens 500 Basenpaare, am meisten bevorzugt mindestens 1000 Basenpaare des 3'-Endes des jeweiligen erfindungsgemäßen Promotors - beispielsweise der Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 -, wobei die Länge vom Translationsstart ("ATG"-Kodon) in  
30 5'-Richtung stromaufwärts gerechnet wird.

Weitere funktionell äquivalente Fragmente können beispielsweise durch Deletion eventuell noch vorhandener 5'-untranslatierter Bereiche erzeugt werden. Zu diesem Zweck kann der Transkriptions-  
35 start der entsprechenden Gene durch dem Fachmann geläufige Verfahren (wie beispielsweise 5'-RACE) bestimmt und die 5'-untranslatierten durch PCR-vermittelte Methoden oder Endonukleaseverdau deletiert werden. So können beispielsweise die in den Promotoren gemäß SEQ ID NO: 7 oder 8 umfassten 5'-untranslatierten Regionen  
40 deletiert werden, ohne dass der Promotor seine wesentliche Funktionalität verliert. Entsprechende Deletionsvarianten sind ausdrücklich als funktionelle Äquivalente umfasst.



## 21

In erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten steht mindestens einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

5

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) mit einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf.

- 10 weiterer genetischer Kontrollsequenzen wie zum Beispiel einem Terminator oder einer Polyadenylierungssequenz derart, dass der Promotor seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz unter geeigneten Bedingungen erfüllen kann und die Expression der Nukleinsäuresequenz (d.h. Transkription
- 15 und gegebenenfalls Translation) erfolgt. "Geeignete Bedingungen" meint dabei bevorzugt das Vorliegen der Expressionskassette in einer pflanzlichen Zelle, bevorzugt einer pflanzlichen Zelle umfasst von einem pflanzlichen Blüte.

- 20 Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter einem der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der
- 25 Promotorsequenz und der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

- 30 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines transgenen Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
- 35 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) und in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience beschrieben sind.
- 40 Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das trans-
- 45 gene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert

## 22

in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

- Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Kon-
- 5 strukturen zu verstehen, bei denen einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8), ohne dass er zuvor notwendigerweise mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft wurde, zum Beispiel über eine gezielte homologe Rekombination oder eine zufällige
- 10 Insertion in ein Wirtsgenom eingeführt wird, dort regulatorische Kontrolle über mit ihm dann funktionell verknüpfte endogene Nukleinsäuresequenzen übernimmt und die transgene Expression derselben steuert. Durch Insertion des Promotors - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor eine für ein bestimmtes
- 15 Polypeptid kodierende Nukleinsäure erhält man eine erfindungsgemäße Expressionskassette, die die Expression des bestimmten Polypeptides gezielt in der pflanzlichen Blüte steuert. Auch kann beispielsweise der natürliche Promotor eines endogenen Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch
- 20 SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) ausgetauscht und so das Expressionsverhalten des endogenen Gens modifiziert werden.

- Ferner kann die Insertion des Promotors auch derart erfolgen, dass antisense-RNA oder eine doppelsträngige RNA (z.B. in Form
- 25 eines invertierten "Repeats") zu der für ein bestimmtes Polypeptid kodierenden Nukleinsäure exprimiert wird. Damit wird selektiv die Expression des bestimmten Polypeptides in der pflanzlichen Blüte herunterreguliert oder ausgeschaltet.

- 30 Analog kann auch eine transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - hinter die Sequenz kodierend für einen der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8), die sich in ihrem natürlichen chromosomalen Kontext befindet, so plziert
- 35 werden, dass man eine erfindungsgemäße Expressionskassette erhält, die die Expression der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz in der pflanzlichen Blüte steuert.

- Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten können
- 40 weitere genetische Kontrollsequenzen umfassen. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion einer erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum
- 45 Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten 3'-stromab-

## 23

wärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Promotoren kommen im Prinzip alle in Pflanzen funktionelle Promotoren in Frage. In Pflanzen funktionelle Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind konstitutive Promotoren, gewebespezifische Promotoren, entwicklungsabhängige Promotoren, chemisch-induzierbare stress-induzierbare oder pathogen-induzierbare Promotoren. Entsprechende Promotoren sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren gram-positiver Bakterien wie amy und SPO2 oder in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFA, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH zu finden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)), bevorzugt

## 24

der Gene mit dem Genlocus At2g46720, At3g01980 und At1g63140 aus *Arabidopsis thaliana*. Es kann gezeigt werden, dass derartige Regionen eine signifikante Funktion bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440). Die unter SEQ ID NO: 2, 7 oder 8 angegebenen Nukleinsäuresequenzen repräsentieren jeweils die Promotorregion und die 5'-untranslatierte Regionen bis zum ATG-Startcodon der jeweiligen Gene.

- 15 Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können
- 20 zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.
- 25 Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der
- 30 NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

- Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom
- 35 erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine dsRNA kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung des trans-
- 40 genen Expressionskonstruktes aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

- 45 Eine transgene Expressionskassette und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist

## 25

breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben.

5 Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- 10 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide wie Metabolismusinhibitoren (z.B. 2-Desoxyglucose-6-phosphat; WO 98/45456), Antibiotika (z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder - bevorzugt - Herbizide (z.B. Phosphinotricin) verleihen. Als Selektionsmarker seien beispielhaft genannt: Phosphinotricinacetyltransferasen (bar und pat Gen), welche Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren, 15 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasen (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, Glyphosat® degradierende Enzyme (gox-Genprodukt; Glyphosatoxidoreduktase), Dehalogenasen, welche z.B. Dalapon inaktivieren (deh Genprodukt), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen 20 sowie Nitrilasen, welche z.B. Bromoxynil degradieren (bxn Genprodukt), das aasa-Genprodukt, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleih, Streptomycinphosphotransferasen (SPT), die eine Resistenz gegen Streptomycin gewähren, Neomycinphosphotransferasen (NPTII), die eine 25 Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleihen, das Hygromycinphosphotransferasen (HPT), die eine Resistenz gegen Hygromycin vermitteln, das Acetolactatsynthasen (ALS), die eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleihen (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).
- 30 b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

## 26

- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungs-  
gemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen  
Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten.  
Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication),  
5 der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular  
Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor  
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentrans-  
10 formation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder  
linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

- "Einführen" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die  
dazu geeignet sind, eine Nukleinsäuresequenz (beispielsweise eine  
15 erfindungsgemäße Expressionskassette) direkt oder indirekt, in  
einen Organismus (z.B. ein Pflanze) oder eine Zelle, Komparti-  
ment, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial (z.B. Samen oder  
FRüchte) derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte  
und indirekte Verfahren sind umfasst. Das Einbringen kann  
20 zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter  
Nukleinsäuresequenz führen oder aber auch zu einer dauerhaften  
(stabilen). Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Trans-  
fektion, Transduktion oder Transformation. Die in den Verfahren  
verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem  
25 Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet.

- Das Einführen einer erfindungsgemäßen transgenen Expressions-  
kassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile  
bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche  
30 Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter  
Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die trans-  
genen Expressionskassetten enthalten sind. Vektoren können  
beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agro-  
bakterien sein. Die transgenen Expressionskassetten können in  
35 den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete  
Restriktionsschnittstelle inseriert werden. Der entstandene  
Vektor kann zunächst in E.coli eingeführt und amplifiziert  
werden. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert,  
gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem Fachmann geläufigen  
40 Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können  
dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen. Bevorzugt sind  
solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressions-  
kassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

- 45 Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer  
transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die ent-  
sprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die

## 27.

- entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann
- 5 die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch
- 10 Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zum Einführen von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind
- 15 beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhaus et al. (1987) *Theor Appl Genet* 75:30-36; Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell et al. (1980) *Science* 208:1265; Horsch et
- 20 al. (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).
- 25 Als Vektoren zur Expression in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5
- 30 (Pharmacia Biotech, Inc.).
- Bevorzugte Vektoren zur Expression in Säugerzellen umfassen pWLNE0, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG (Stratagene Inc.); pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL (Pharmacia Biotech, Inc.). Als induzierbare
- 35 Vektoren seien pTet-tTak, pTet-Splice, pcDNA4/TO, pcDNA4/TO / LacZ, pcDNA6/TR, pcDNA4/TO/Myc-His/LacZ, pcDNA4/TO/Myc-His A, pcDNA4/TO/Myc-His B, pcDNA4/TO/Myc-His C, pVgRXR (Invitrogen, Inc.) oder die pMAM-Serie (Clontech, Inc.; GenBank Accession No.: U02443) zu nennen. Diese stellen bereits das induzierbare
- 40 regulatorische Kontrollelement beispielsweise für eine chemisch, induzierbare Expression zur Verfügung.
- Vektoren für die Expression in Hefe umfassen beispielhaft pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9,
- 45 pPIC3.5, PHIL-D2, PHIL-S1, pPIC3SK, pPIC9K, und PA0815 (Invitrogen, Inc.).

## 28

Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation von Ciliaten und Algen sind dem Fachmann bekannt (WO 98/01572; Falciatore et al. (1999) Marine Biotechnology 1(3):239-251; Dunahay et al. (1995) J Phycol 31:10004-1012).

5

Prinzipiell sind für die Transformation tierischer Zellen oder von Hefezellen ähnliche Verfahren wie für die "direkte" Transformation von pflanzlichen Zellen anzuwenden. Insbesondere Verfahren wie die Calciumphosphat oder Liposomen vermittelte Transformation oder aber Elektroporation sind bevorzugt.

Verschiedene Methoden und Vektoren zum Einschleusen von Genen in das Genom von Pflanzen sowie zur Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen sind bekannt (Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); White FF (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und Wu R, Academic Press, 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225; Halford NG, Shewry PR (2000) Br Med Bull 56(1):62-73). Dazu zählen beispielhaft die oben erwähnten. Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Calciumphosphat-vermittelte Transformation, DEAE-Dextran-vermittelte Transformation, Liposomen vermittelte Transformation (Freeman et al. (1984) Plant Cell Physiol. 29:1353ff; US 4,536,475), biolistische Verfahren mit der Genkanone ("particle bombardment" Methode; US 5,100,792; EP-A 0 444 882; EP-A 0 434 616; Fromm ME et al. (1990) Bio/Technology 8(9):833-9; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, Elektroporation (EP-A 290 395, WO 87/06614), Mikroinjektion (WO 92/09696, WO 94/00583, EP-A 0 331 083, EP-A 0 175 966) oder andere Methoden der direkten DNA-Einführung (DE 4 005 152, WO 90/12096, US 4,684,611). Physikalische Methoden der DNA-Einführung in pflanzliche Zellen sind im Überblick dargestellt bei Oard (1991) Biotech Adv 9:1-11.

Im Falle dieser "direkten" Transformationsmethoden sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe, pBR322, M13mp Reihe, pA-CYC184 etc. können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen



## 29

aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

5 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobakterium (z.B. EP 0 116 718), virale Infektion mittels viraler Vektoren (EP 0 067 553; US 4,407,956; WO 95/34668; WO 93/03161) oder mittels Pollen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4,684,611) durchgeführt  
10 werden.

Bevorzugt erfolgt die Transformation mittels Agrobakterien, die "entwaffnete" (disarmed) Ti-Plasmidvektoren enthalten, wobei deren natürliche Fähigkeit zum Gentransfer auf Pflanzen genutzt  
15 wird (EP-A 0 270 355; EP-A 0 116 718).

Agrobakterium-Transformation ist weit verbreitet für die Transformation von Dicotyledonen, wird aber auch zunehmend auf Monocotyledonen angewandt (Toriyama et al. (1988) Bio/Technology 6:  
20 1072-1074; Zhang et al. (1988) Plant Cell Rep 7:379-384; Zhang et al. (1988) Theor Appl Genet 76:835-840; Shimamoto et al. (1989) Nature 338:274-276; Datta et al. (1990) Bio/Technology 8: 736- 740; Christou et al. (1991) Bio/Technology 9:957-962; Peng et al. (1991) International Rice Research Institute, Manila,  
25 Philippines 563-574; Cao et al. (1992) Plant Cell Rep 11:585-591; Li et al. (1993) Plant Cell Rep 12:250-255; Rathore et al. (1993) Plant Mol Biol 21:871-884; Fromm et al. (1990) Bio/Technology 8:833-839; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603-618; D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505; Walters et al.  
30 (1992) Plant Mol Biol 18:189-200; Koziel et al. (1993) Bio-technology 11:194-200; Vasil IK (1994) Plant Mol Biol 25:925-937; Weeks et al. (1993) Plant Physiol 102:1077-1084; Somers et al. (1992) Bio/Technology 10:1589-1594; WO 92/14828; Hiei et al. (1994) Plant J 6:271-282).

35

Die für die Agrobakterium-Transformation meist verwendeten Stämme Agrobakterium tumefaciens oder Agrobakterium rhizogenes enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach Agrobakterium-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids,  
40 genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Alternativ können durch Agrobakterium auch binäre Vektoren (Mini-Ti-Plasmide) auf Pflanzen übertragen und in deren Genom integriert werden.

45 Die Anwendung von Agrobakterium tumefaciens für die Transformation von Pflanzen unter Verwendung von Gewebekultur-explantaten ist beschrieben (u.a. Horsch RB et al. (1985)

Science 225:1229ff.; Fraley et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 4803-4807; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-187).

Viele Stämme von Agrobacterium tumefaciens sind in der Lage, genetisches Material - beispielsweise die erfindungsgemäßen

- 5 Expressionskassetten - zu übertragen, wie z.B. die Stämme EHA101[pEHA101], EHA105[pEHA105], LBA4404[pAL4404], C58C1[pMP90] und C58C1[pGV2260] (Hood et al. (1993) Transgenic Res 2:208-218; Hoekema et al. (1983) Nature 303:179-181; Koncz and Schell (1986) Gen Genet 204:383-396; Deblaere et al. (1985) Nucl Acids Res 13: 10 4777-4788).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen

- 15 binären Vektor. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet, die sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren können. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium 20 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium 25 kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP-A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Ver- 30 schiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA; Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711), pBinAR, pPZP200 oder pPTV.

- 35 Die mit einem solchen Vektor transformierten Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Raps, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen 40 durch Agrobakterien ist beschrieben (White FF (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for 45 Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant

## 31

Molec Biol 42:205-225). Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die integriert die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Expressionssysteme enthalten.

5

Stabil transformierte Zellen (d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten) können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker

- 10 kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen ein Biozid (z.B. ein Antibiotikum oder Herbizid (s.o.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Biozids zu überleben, die
- 15 einen untransformierten Wildtyp abtöten. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert
- 20 werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann be-

- 25 kannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen, einzelnen Zellen (z.B. Protoplasten) oder Blattscheiben aus (Vasil et al. (1984) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II and III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press; Weissbach and Weissbach
- 30 (1989) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press). Aus diesen noch undifferenzierten Kallus-Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Fennell et al. (1992)
- 35 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533).

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristemver-

- 40 mehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression eines Zielgens und die Auswirkung auf den Phänotyp der Pflanze an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

45

## 32

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei 5 pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

Unter Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryotische oder eukaryotische Organismen, wie beispielsweise 10 Mikroorganismen oder pflanzliche Organismen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung Escherichia, Erwinia, Agrobakterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Pseudomonas, 15 Bacillus oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung Synechocystis und weitere in Brock Biology of Microorganisms Eighth Edition auf den Seiten A-8, A-9, A10 und A11 beschriebenen Bakteriengattungen.

20 Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Konstrukte befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung Agrobakterium und insbesondere der Art Agrobakterium tumefaciens. Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind 25 solche, die zur Produktion von Toxinen (z.B. Botulinus Toxin), Pigmenten (z.B. Carotinoiden oder Flavonoiden), Antibiotika (z.B. Penicillin), Phenylpropanoiden (z.B. Tocopherol), Polyungesättigten Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) oder Vitaminen (z.B. Vitamin B12) befähigt sind.

30 Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia.

Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, 35 Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangs- 40 organismen sind vor allem pflanzliche Organismen.

## 33

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines zur Photosynthese befähigten Organismus. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle 5 Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und 10 Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte), Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum 15 Beispiel Zell- oder Kalluskulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungs- 20 stadium.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grün- 25 algen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Insbesondere bevorzugt sind Synechocystis, Chlamydomonas und Scenedesmus.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind insbesondere 30 pflanzliche Organismen bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Blütenpflanzen (Phylum Anthophyta "Angiospermen"). Umfasst sind alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen. Bevorzugt ist die Pflanze aus nachfolgenden Pflanzenfamilien ausgewählt: Amaranthaceae, Asteraceae, 35 Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae und Umbelliferae.

40

45

## 34

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel den nachfolgenden

5

- 1) Kategorie: Dicotyledonae (Dicotyledonen). Bevorzugte Familien:

- Aceraceae (Ahornhölzer)
- 10 - Cactaceae (Kakteen)
- Rosaceae (Rosen, Äpfel, Mandeln, Erdbeeren)
- 15 - Salicaceae (Weiden)
- Asteraceae (Compositae) besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat), sowie Sonnenblume, Löwenzahn, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- 20 - Cruciferae (Brassicaceae), besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea (z.B. Kohl, Blumenkohl oder Broccoli und weitere Kohlarten); und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana
- 25 sowie Kresse, Rettich, Canola und andere mehr,
- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis, Gurken oder Zucchini und andere mehr,
- 30 - Leguminosae (Fabaceae) besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Lupine oder Erdnuss und andere mehr,
- Malvaceae insbesondere Malve, Baumwolle, essbarer Eibisch,
- 35 Hibiscus und andere mehr,
- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,
- 40 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum
- 45 (Paprika), sowie Tabak, Petunie und andere mehr,

## 35

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakaostrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- Umbelliferae (Apiaceae), besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)), Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Sellerie)) sowie Petersilie und andere mehr;

sowie Lein, Hanf, Flachs, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

Darüberhinaus sind jedoch auch monokotyle Pflanzen geeignet. Bevorzugt sind diese ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel den Familien

- Arecaceae (Palmen)
- Bromeliaceae (Ananas, spanisches Moos)
- Cyperaceae (Seggen)
- Liliaceae (Lilien, Tulpen, Hyazinthen, Zwiebel, Knoblauch)
- Orchidaceae (Orchideen)
- Poaceae (Gräser, Bambusse, Mais, Zuckerrohr, Weizen)
- Iridaceae (Blenden, Gladiolen, Krokusse)

Ganz besonders bevorzugt sind Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

Im Rahmen der erfindungsgemäßen Expressionskassette kann die Expression einer bestimmten Nukleinsäure durch einen Promotor mit Spezifität für die pflanzliche Blüte zu Bildung von sense-RNA, antisense RNA oder doppelsträngiger RNA in Form einer inversen Wiederholung (dsRNAi) führen. Die sense-RNA kann infolge in bestimmte Polypeptide translatiert werden. Mit der antisense-RNA und dsRNAi kann die Expression bestimmter Gene herunterreguliert werden.

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die

## 36

in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen.

Die Spezifität der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte  
5 und Vektoren für pflanzliche Blüten ist besonders vorteilhaft.  
Die Blüte hat eine Funktion im Anlocken von Nutzinsekten durch  
Pigmenteinlagerung oder Synthese flüchtiger Chemikalien.

Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze zum Bei-  
10 spiel gegen Pathogene unzureichend. Die Einführung fremder Gene  
aus Pflanzen, Tieren, oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr  
verstärken. Beispiel sind der Schutz gegen Insektenfrass in  
Tabak durch Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin  
(Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des  
15 Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus  
der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197).

Kälteeinbrüche in der Blütezeit führen jedes Jahr zu erheblichen  
Ernteverlusten. Eine gezielte Expression schützender Proteine  
20 gezielt in der Blüteperiode kann einen Schutz gewähren.

Für eine hohe Effizienz solcher gentechnischer Ansätze ist  
eine konzentrierte Expression der entsprechenden transgen zu  
exprimierenden Nukleinsäuresequenz vor allem in den Petalen der  
25 Blüte vorteilhaft. Eine konstitutive Expression in der gesamten  
Pflanze kann den Effekt zum Beispiel durch eine Verdünnung in  
Frage stellen oder das Wachstum der Pflanze bzw. die Qualität des  
Pflanzenproduktes beeinträchtigen. Außerdem kann es durch eine  
konstitutive Expression verstärkt zum Abschalten des Transgens  
30 kommen ("gene silencing").

Hierzu sind Promotoren mit Spezifität für die Blüte vorteilhaft.  
Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Proteinen bekannt, deren  
rekombinante Expression in der Blüte vorteilhaft sind. Ferner  
35 sind dem Fachmann eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren  
Reprimierung oder Ausschaltung mittels Expression einer ent-  
sprechenden antisense-RNA ebenfalls vorteilhafte Effekte erreicht  
werden können. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend für vor-  
teilhafte Effekte seien zu nennen: Das Erzielen einer Resistenz  
40 gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, Trockenheit,  
erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung) und biotische  
Stressfaktoren (Pathogene, Viren, Insekten und Krankheiten),  
die Verbesserung von Nahrungs- oder Futtereigenschaften, die  
Verbesserung der Wachstumsrate oder des Ertrages, das Erzielen  
45 einer längeren oder früheren Blütezeit, die Veränderung oder  
Verstärkung des Duftes oder der Farbgebung der Blüten. Für die  
in diesen Anwendungen einsetzbaren Nukleinsäuresequenzen oder



## 37

Polypeptide seien beispielhaft, aber nicht einschränkend, zu nennen:

1. Verbesserter UV-Schutz der pflanzlichen Blüte durch Veränderung der Pigmentierung durch Expression bestimmter Polypeptide wie Enzyme oder Regulatoren der Flavonoidbiosynthese (z.B. Chalconsynthasen, Phenylalaninammoniumlyasen), der DNA-Reparatur (z.B. Photolyasen; Sakamoto A et al. (1998) DNA Seq 9(5-6):335-40), der Isoprenoidbiosynthese (z.B. Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen), der IPP-Synthese oder der Carotinoidbiosynthese (z.B. Phytoensynthasen, Phytoendesaturasen, Lycopincyclasen, Hydroxylasen oder Ketolasen). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Chalconsynthase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: M20308), die 6-4 Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: BAB00748) oder das Blaulicht-Photorezeptor/Photolyase-Homolog (PHH1) aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U62549) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
2. Verbesserter Schutz der pflanzlichen Blüte gegen abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, oder Kälte zum Beispiel durch Überexpression von dem "antifreeze"-Polypeptiden (z.B. aus *Myoxocephalus Scorpius*; WO 00/00512), dem *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsaktivator CBF1, Glutamatdehydrogenasen (WO 97/12983, WO 98/11240), einem späten Embryogenesegen (LEA) zum Beispiel aus Gerste (WO 97/13843), Calcium-abhängigen Proteinkinasegenen (WO 98/26045), Calcineurinen (WO 99/05902), Farnesyltransferasen (WO 99/06580; Pei ZM et al. (1998) Science 282:287-290), Ferritin (Deak M et al. (1999) Nature Biotechnology 17:192-196), Oxalatoxidase (WO 99/04013; Dunwell JM (1998) Biotechnology and Genetic Engeneering Reviews 15:1-32), DREB1A-Faktor (dehydration response element B 1A; Kasuga M et al. (1999) Nature Biotechnology 17:276-286), Genen der Mannitol- oder Trehalose-synthese (z.B. Trehalosephosphatsynthasen; Trehalosephosphatphosphatasen, WO 97/42326); oder durch Inhibition von Genen wie der Trehalase (WO 97/50561). Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den transkriptionellen Aktivator CBF1 aus *Arabidopsis thaliana* (Gen-Bank Acc.-No.: U77378) oder das "antifreeze"-Protein" aus *Myoxocephalus octodecemspinosus* (GenBank Acc.-No.: AF306348) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
3. Erreichen einer Resistenz zum Beispiel gegen Pilze, Insekten, Nematoden und Krankheiten durch gezielte Absonderung oder Anreicherung bestimmter Metaboliten oder Proteine in der Blüte. Beispielhaft seien genannt Glucosinolate (Nematoden-

## 38

- abwehr), Chitinasen oder Glucanasen und andere Enzyme, die die Zellwand von Parasiten zerstören, Ribosom-inaktivierende Proteine (RIPs) und andere Proteine der pflanzlichen Resistenz- und Stressreaktion, wie sie bei Verletzung oder mikrobiellen Befall von Pflanzen oder chemisch durch zum Beispiel Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert werden, Lysozyme aus nicht-pflanzlichen Quellen wie zum Beispiel T4 Lysozym oder Lysozym aus verschiedenen Säugern, insektizide Proteine wie *Bacillus thuringiensis* Endotoxin,  $\alpha$ -Amylase-inhibitor oder Proteaseinhibitoren (cowpea Trypsininhibitor), Glucanasen, Lektine (z.B. Phytohemagglutinin, Schneeglöckchenlectin, Weizenkeimagglutinin), RNAsen oder Ribozyme. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die chit2 Endochitinase aus *Trichoderma harzianum* (GenBank Acc.-No.: S78423) oder für das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450 (CYP79) aus *Sorghum bicolor* (GenBank Acc.-No.: U32624) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 20 4. Erreichen einer Insektenabwehr oder -anlockung zum Beispiel durch erhöhte Freisetzung flüchtiger Duft- oder Botenstoffe durch zum Beispiel Enzyme der Terpenbiosynthese.
- 25 5. Erreichen einer Speicherfähigkeit in Blütengeweben, die normalerweise keine Speicherproteine oder -lipide enthalten mit dem Ziel, den Ertrag an diesen Substanzen zu erhöhen, z.B. durch Expression einer Acetyl-CoA-Carboxylase oder von Enzymen zur Veresterung von Metaboliten. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Acetyl-CoA Carboxylase (Accase) aus *Medicago sativa* (GenBank Acc.-No.: L25042) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 30
- 35 6. Expression von Transportproteinen, die die Aufnahme von Metaboliten, Nährstoffen oder Wasser in die Blüte verbessern und so das Blütenwachstum, die Metabolitenzusammensetzung oder den Ertrag optimieren, zum Beispiel durch Expression eines Aminosäuretransporters, der die Aufnahme von Aminosäuren beschleunigt, oder eines Monosaccharid-Transporters, der die Aufnahme von Zuckern fördert. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den kationische Aminosäure-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: X92657) oder für den Monosaccharid-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: AJ002399) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 40
- 45

## 39

7. Expression von Genen, die eine Akkumulation von Feinchemikalien, wie von Tocopherolen, Tocotrienolen, Phenylpropanoiden, Isoprenoiden oder Carotinoiden, in der Blüte bewirken. Beispielhaft seien die Deoxyxylulose-5-phosphat-synthasen, Phytoensynthasen, Lycopin- $\beta$ -cyklasen und die  $\beta$ -Carotinketolasen genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die *Haematoccus pluvialis* NIES-144 (Acc. No. D45881) Ketolase oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 10 8. Modifikation der Wachsesterbildung oder der Zusammensetzung der eingelagerten Oligosaccharide zur Verbesserung des Schutzes gegen Umwelteinflüsse oder zur Verbesserung der Verdaubarkeit beim Einsatz in Futter- oder Nahrungsmitteln. Beispielhaft sein die Überexpression der Endoxyloglucantransferase genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Endo-xyloglucantransferase (EXGT-A1) aus *Arabidopsis thaliana* (Gen-Bank Acc.-No.:AF163819) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 20 9. Expression von Genen, DNA Bindeproteinen, dsRNA und antisense Konstruktionen, zur Veränderung der Blütenmorphologie, des Blühzeitpunktes und der Blütenseneszenz sowie des Blütenmetabolismus. Bevorzugt sind Konstruktionen, die die Anzahl der Petalen erhöhen z.B. durch Herunterregulation von AGAMOUS und dessen homologen Genen (Yanofsky MF et al. (1990) Nature 346:35-39) den Blühzeitpunkt verfrühen z.B. durch Herunterregulation von FLOWERING LOCUS C (FLC) (Tadege M et al. (2001) Plant J 28(5):545-53) oder verspäten z.B. durch Überexpression von FLC und die Seneszenz verzögern z.B. durch Vermittlung einer blütenspezifischen Ethyleninsensitivität.
10. Erzeugung von sterilen Pflanzen durch Verhinderung der Befruchtung und/oder der Keimung mit Hilfe der Expression eines geeigneten Inhibitors zum Beispiel eines Toxins in Blüten.
11. Produktion von Nutraceuticals wie zum Beispiel
- a) Carotinoide und/oder Phenylpropanoide z.B. durch Optimierung der blüteneigenen Stoffwechselwege z.B. durch Expression von Enzymen und Regulatoren der Isoprenoidbiosynthese. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Chalconsynthase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: M20308), die 6-4 Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.No.:BAB00748) oder den Blaulicht-Photorezeptor / Photolyase Homolog (PHH1) aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U62549) oder funktionelle

## 40

- Äquivalente derselben kodieren. Ebenso bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für Enzyme und Regulatoren der Isoprenoidbiosynthese wie die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen und der Carotinoidbiosynthese wie die Phytoensynthasen, Lycopincyclasen und Ketolasen wie von Tocopherolen, Tocotrienolen, Phenylpropanoiden, Isoprenoiden oder Carotiniden, in der Blüte bewirken. Beispielhaft seien die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen, Phytoensynthasen, Lycopincyclasen und die Carotinketolasen genannt. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die *Haematoccus pluvialis*, NIES-144 (Acc. No. D45881) Ketolase oder funktionelle Äquivalente kodieren.
- b) Polyungesättigte Fettsäuren wie beispielsweise Arachidonsäure oder EP (Eicosapentaensäure) oder DHA (Docosahexaensäure) durch Expression von Fettsäureelongasen und/oder -desaturasen oder Produktion von Proteinen mit verbessertem Nahrungswert wie zum Beispiel mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (z.B. das methioninreiche 2S Albumin der Brasilnuss). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für das methioninreiche 2S-Albumin aus *Bertholletia excelsa* (GenBank Acc.-No.: AB044391), die  $\Delta 6$ -Acylipiddesaturase aus *Physcomitrella patens* (GenBank Acc.-No.: AJ222980; Girke et al. (1998) Plant J 15:39-48), die  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Sakura-dani et al 1999 Gene 238:445-453), die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. (1998) FEBS Letters 439:215-218), die  $\Delta 5$ -Fettsäuredesaturase (des-5) aus *Caenorhabditis elegans* (GenBank Acc.-No.: AF078796), die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Michaelson et al. J Biol Chem 273:19055-19059), die  $\Delta 6$ -Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al. (2000) Proc Natl. Acad. Sci. 97:6421-6426), die  $\Delta 6$ -Elongase aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. (2000,) Biochemical Society Transactions 28:654-657) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
12. Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern, Vakzinen, Hormonen und/oder Antibiotika wie z.B. beschrieben bei Hood EE & Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK & Vine ND (1999) CurrTop Microbiol Immunol 236:275-92.

## 41

Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM (2000) Transgenic approaches to crop improvement. J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte,  
10 zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

- Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen, wobei  
15 ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder deren Biosynthese katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte  
20 Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie  
25 Carotinoiden wie beispielsweise Astaxanthin. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei  
30 Hood EE & Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10 (4)382-6; Ma JK & Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenzen (bevorzugt  
35 der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) zur Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase.

- Bei einer verminderten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit  
40 durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin vermindert.

- "Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einer  $\epsilon$ -Cyclase, bzw. sei Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität  
45 weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer

$\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen.

Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine  
5 mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immuno-  
logische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Dabei wird eine bestimmte  
 $\epsilon$ -Cyclases (bzw. die zugehörige Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder  
10 Aktivität) in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 % vermindert. Insbesondere meint Verminderung auch das vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (bzw. seiner Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität).

15 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität der  $\epsilon$ -Cyclase umfasst. Der Fachmann erkennt, dass eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung stehen, um die Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder  
20 Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase in gewünschter Weise zu beeinflussen. Beispielhaft kann die Verminderung durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäuresequenz, die eine zumindest teilweise Homologie zu den erfindungsgemäßen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenzen aufweist ( $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-dsRNA), realisiert  
25 werden. Alternativ können auch die dsRNA-Expression gewährleistende Expressionskassetten angebracht werden.

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist viel-  
30 fach für tierische und pflanzliche Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird  
35 hiermit ausdrücklich Bezug genommen. dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hoch-effiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechen-  
40 den knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

„Doppelsträngiges RNA-Molekül“ meint im Rahmen der Erfindung bevorzugt eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund  
45 komplementärer Sequenzen theoretisch (z.B. gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick) und/oder faktisch (z.B. aufgrund von Hybridisierungsexperimenten in vitro und/oder in vivo) in der

## 43

Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden. Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden  
5 dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei  
10 Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

15

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und

20

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

25 Bevorzugt meint ist der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase durch eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrieben.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor Zielsequenz aufweisen kann und  
30 dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt.

Bevorzugt beträgt die Homologie (nach weiter unten folgender Definition) mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 %  
35 zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für einen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor (bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nukleinsäuresequenz kodierend für einen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor). Dem Fachmann ist dabei bewusst, dass  
40 bei einem Homologievergleich zwischen RNA und DNA die Basen Uracil und Thymin als äquivalent zu werten sind.

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht  
45 der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Poly-

## 44

morphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können.

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil einer  $\epsilon$ -Cyclase Gen- oder Promotorsequenz zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

"Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor" meint Fragmente einer für einen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt den Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder funktionellen äquivalenten derselben. Dabei haben die Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen.

Die Verwendung der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorregion zur Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität ist insbesondere vorteilhaft, da hier nur geringe Homologien zu anderen Genen vorliegen und so eine hohe Spezifität der Verminderung ohne Auswirkung auf die Expression anderer Gene erreicht werden kann.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden. Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang



## 46

- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

5

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

- Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-dsRNA auf dem Expressionsvektor enthalten. Entsprechende Expressionsvektoren sind erfindungsgemäß umfasst.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors. Bevorzugt ist der in diesem Zusammenhang eingesetzte Promotor nicht der  $\epsilon$ -Cyclase Promotor, von dem die dsRNA abgeleitet wurde. Es kann sich aber sehr wohl um einen  $\epsilon$ -Cyclase Promotor einer anderen Art handeln. So könnte beispielsweise der  $\epsilon$ -Cyclase Promotor aus Sonnenblume dazu verwendet werden, die dsRNA abgeleitet von dem  $\epsilon$ -Cyclase Promotor aus *Tagetes erecta* zu exprimieren. Bevorzugt steht die Expression der dsRNA abgeleitet von einem  $\epsilon$ -Cyclase Promotor jedoch unter Kontrolle eines Promotors der kein  $\epsilon$ -Cyclase Promotor ist, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des CHRC-Promotors aus *Cucumis sativus* (SEQ ID NO: 81) oder des AP3P-Promotors (SEQ ID NO: 77) oder eines funktionell äquivalenten Teils derselben

- Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbst-komplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

- Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

47

Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden, wobei die mRNA-Menge und/oder Aktivität mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase vermindert wird durch Einbringen mindestens einer der erfindungsgemäßen doppelsträngigen RNA-  
5 Sequenzen oder Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten.

Ketocarotinoide meint Carotinoide, die mindestens eine Keto-  
10 Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

15

20

25

30

35

40

45

## 48

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*  
5
2. SEQ ID NO: 2 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*  
10
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor einschließlich 5'-untranslatierter Region und Region kodierend für das Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*  
15
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für das mutmaßliche Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*  
20
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* flankiert von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung  
25
6. SEQ ID NO: 6 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor einschließlich 5'-untranslatierter Region und Region kodierend für das Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* flankiert von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung  
30
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana*  
35
8. SEQ ID NO: 8 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa*  
40
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*  
45

## 49

10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 5 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase aus *Tagetes erecta*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für die  
ε-Cyclase *Tagetes erecta*
- 10 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase aus *Arabidopsis thaliana*
14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase aus *Arabidopsis thaliana*
- 15 15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase aus Reis
- 20 16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase aus Reis
- 17.-22 SEQ ID NO: 17 bis 22: Sequenzmotive für ε-Cyclase Proteine
- 25 23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H1) aus *Lactuca sativa*
- 30 24. SEQ ID NO: 24 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H1) aus *Lactuca sativa*
- 35 25. SEQ ID NO: 25 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H2) aus *Adonis palaestina*
- 40 26. SEQ ID NO: 26 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H2) aus *Adonis palaestina*
- 45 27. SEQ ID NO: 27 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H3) aus *Adonis palaestina*
28. SEQ ID NO: 28 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H3) aus *Adonis palaestina*

## 50

29. SEQ ID NO: 29 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H4) aus  
Arabidopsis thaliana
- 5 30. SEQ ID NO: 30 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H4) aus  
Arabidopsis thaliana
- 10 31. SEQ ID NO: 31 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H5) aus Citrus X  
paradisi
- 15 32. SEQ ID NO: 32 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H5) aus Citrus X  
paradisi
- 20 33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H6) aus Citrus X  
paradisi
- 25 34. SEQ ID NO: 34 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H6) aus Citrus X  
paradisi
- 30 35. SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H7) aus Citrus  
sinensis
- 35 36. SEQ ID NO: 36 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H7) aus Citrus  
sinensis
- 40 37. SEQ ID NO: 37 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H8) aus Spinacea  
oleracea
- 45 38. SEQ ID NO: 38 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H8) aus Spinacea  
oleracea
39. SEQ ID NO: 39 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H9) aus Solanum  
tuberosum

## 51

40. SEQ ID NO: 40 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H9) aus Solanum  
tuberosum
- 5 41. SEQ ID NO: 41 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H10) aus Daucus  
carota
- 10 42. SEQ ID NO: 42 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H10) aus Daucus  
carota
- 15 43. SEQ ID NO: 43 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H11) aus Daucus  
carota
- 20 44. SEQ ID NO: 44 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H11) aus Daucus  
carota
- 25 45. SEQ ID NO: 45 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H12) aus Tomate
46. SEQ ID NO: 46 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H12) aus Tomate
47. SEQ ID NO: 47 Nukleinsäuresequenz kodierend für ε-Cyclase-  
spezifische Sonde (gecycl; 510 bp)
- 30 48. SEQ ID NO: 48 Oligonukleotidprimer PR16  
5'-ggcacgaggcaaagcaaagg-3'
49. SEQ ID NO: 49 Oligonukleotidprimer PR22  
5'-cgataagtgcgacattcaagc-3'
- 35 50. SEQ ID NO: 50 Nukleinsäuresequenz umfassend Teil des  
Promotors der ε-Cyclase aus Tagetes erecta  
erhalten mittels iPCR
- 40 51. SEQ ID NO: 51 Nukleinsäuresequenz umfassend Teil des  
Promotors der ε-Cyclase aus Tagetes erecta  
erhalten mittels TAIL-PCR
- 45 52. SEQ ID NO: 52 Oligonukleotidprimer PR50  
5'-cgccttgatatctgtttggattgg-3'

## 52

53. SEQ ID NO: 53 Oligonukleotidprimer PR51  
5'-ctaacaatcaatgagtatgagagc-3'
54. SEQ ID NO: 54 Oligonukleotidprimer PR60  
5'-agagcaaggccagcaggaccacaacc-3'
55. SEQ ID NO: 55 Oligonukleotidprimer PR61  
5'-ccttgggagcttttgggataggctag-3'
56. SEQ ID NO: 56 Oligonukleotidprimer PR63  
5'-tcacgccttgtatctgtttggattgg-3'
57. SEQ ID NO: 57 Oligonukleotidprimer aus dem Satz der AD1  
Primer, wie er in dem Amplifikat wieder  
gefunden wurde 5'-gtcgagtatggagtt-3'
58. SEQ ID NO: 58 Nukleinsäuresequenz kodierend iPCR-Fragment  
(734 bp) aus pTA-ecycP
59. SEQ ID NO: 59 Oligonukleotidprimer OL1  
5'-ctcgagagtaaaatcgtttagttatg-3'
60. SEQ ID NO: 60 Oligonukleotidprimer OL2  
5'-ccatgggccattgattgtagtaattgatc-3'
61. SEQ ID NO: 61 Oligonukleotidprimer OL3  
5'-ccatggtaatttgcttcgtgtatctgatg-3'
62. SEQ ID NO: 62 Oligonukleotidprimer OL4  
5'-ccatggcgctagcagcgacagtaatg-3'
63. SEQ ID NO: 63 Oligonukleotidprimer OL5  
5'-gatatccggtgtgaggggaactag-3'
64. SEQ ID NO: 64 Oligonukleotidprimer PR1  
5'-gcaagctcgacagctacaaacc-3'
65. SEQ ID NO: 65 Oligonukleotidprimer PR2  
5'-gaagcatgcagctagcagcgacag-3'
66. SEQ ID NO: 66 Nukleinsäuresequenz kodierend für  
Ketolase-35S-Terminator Konstrukt
67. SEQ ID NO: 67 Oligonukleotidprimer PR7  
5'-gagctcactc actgatttcc attgcttg-3'

## 53

68. SEQ ID NO: 68 Oligonukleotidprimer PR8  
5'-cgccgttaagtcgatgtccggttgatttaaacagtgtc-3'
- 5 69. SEQ ID NO: 69 Oligonukleotidprimer PR9  
5'-atcaacggac atcgacttaa cggcggttgt aaac-3'
70. SEQ ID NO: 70 Oligonukleotidprimer PR10  
5'-taagcttttt gttgaagaga tttgg-3'
- 10 71. SEQ ID NO: 71 Oligonukleotidprimer PR40  
5'-gtcgactacg taagtttctg cttctacc-3'
72. SEQ ID NO: 72 Oligonukleotidprimer PR41  
5'-ggatccggtg atacctgcac atcaac-3'
- 15 73. SEQ ID NO: 73 Oligonukleotidprimer PR124  
5'-aagcttaccg atagtaaaat cgtagtt-3'
74. SEQ ID NO: 74 Oligonukleotidprimer PR125  
20 5'-ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t-3'
75. SEQ ID NO: 75 Oligonukleotidprimer PR126  
5'-gtcgacaaca acaacaaca acctttgc-3'
- 25 76. SEQ ID NO: 76 Oligonukleotidprimer PR127  
5'-ggatccaaca acaacaaca acctttgc-3'
77. SEQ ID NO: 77 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
30 modifizierte Version (AP3P) des blüten-  
spezifischen Promoters AP3 aus Arabidopsis  
thaliana
78. SEQ ID NO: 78 Nukleinsäuresequenz kodierend für PIV2  
35 Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel.
79. SEQ ID NO: 79 Nukleinsäuresequenz kodierend für den sense-  
Strang der gegen den  $\epsilon$ -Cyclase Promotor  
gerichteten dsRNA.
- 40 80. SEQ ID NO: 80 Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
antisense-Strang der gegen den  $\epsilon$ -Cyclase  
Promotor gerichteten dsRNA.



## 54

81. SEQ ID NO: 81 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor des Chromoplasten-spezifischen Carotenoid-assoziierten Proteins (CHRC) aus *Cucumis sativus*

5

82. SEQ ID NO: 82 Oligonukleotidprimer PRCHRC5  
5'-gagctctaca aattagggtt ac-3'

10

83. SEQ ID NO: 83 Oligonukleotidprimer PRCHRC3  
5'-aagcttatta tttccaaatt ccg-3'

## Abbildungen

Die in nachfolgenden Abbildungen verwendeten allgemeinen

15 Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

	GUSI-Intron-GUSII: Reportergen (bakterielle $\beta$ -Glucuronidase)
	Intron: Intron
	NosT: Terminatorsequenz der Nopalinsynthase (NOS)
20	RB/LB: Rechte bzw. linke T-DNA Begrenzung
	35-T: 35S CaMV Terminator
	NptII: Kanamycin Resistenz
	NosP: Promotorsequenz der Nopalinsynthase (NOS)
	aadA: bakterielle Spectinomycin Resistenz
25	colEl: Replikationsursprung

30

1. Fig. 1: Analyse der Ecyclase-Transkriptlevel Gesamt-RNA isoliert aus Blättern (L) und Blütenstadien (1-7) von *Tagetes erecta* mittels RNA-Gel-Blot Analyse

2. Fig. 2: Schematische Darstellung des Vektors pEcycP1:GUS zur blütenspezifischen Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens (GUS) unter Kontrolle des *Tagetes erecta* ecycP1-Regulationselements (Promoter und 5'-untranslatierte Region)

35

ecycP1: Promotor der e-Cyclase aus *Tagetes erecta* einschließlich 5'-untranslatierter Region (SEQ ID NO: 2)

40 3. Fig.3: Schematische Darstellung des Vektors pEcycP2:GUS zur blütenspezifischen Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens (GUS) unter Kontrolle des *Tagetes erecta* ecycP2-Regulationselements (Promoter und 5'-untranslatierte Region und Transitpeptid)

45

## 55

ecycP2: Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*  
einschließlich 5'-untranslatierter Region  
und Transitpeptid (SEQ ID NO: 3)

- 5 4. Fig.4: Schematische Darstellung des Vektors pEcycP2:KETO zur  
blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis*  
Ketolase (KETO; SEQ ID NO: 66) unter Kontrolle des *Tagetes*  
*erecta* ecycP2-Regulationselements (Promoter und 5'-untrans-  
latierte Region und Transitpeptid; SEQ ID NO: 3).
- 10 5. Fig.5: Schematische Darstellung des Vektors pS5AI7 zur  
blütenspezifischen Expression von  $\epsilon$ -Cyclase-Promoter spezi-  
fischer dsRNA unter Kontrolle des AP3P Promoterfragments  
zur blütenspezifischen Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Transkript-  
15 level.  
AP3P: modifizierter AP3P Promoter (777 bp),  
P-sense: 358 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase in sense  
Orientierung,  
intron: IV2 Intron des Kartoffel-Gens ST-LS1  
20 P-anti: das 361 bp Promoterfragment  $\epsilon$ -Cyclase in antisense  
Orientierung.
6. Fig.6: Schematische Darstellung des Vektors pS5CI7 zur  
blütenspezifischen Expression von  $\epsilon$ -Cyclase-Promoter spezi-  
25 fischer dsRNA unter Kontrolle des CHRC Promoterfragments zur  
blütenspezifischen Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel
- CHRC: CHRC-Promoter (1537 bp),  
P-sense: 358 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase in sense  
Orientierung,  
30 intron: IV2 Intron des Kartoffel-Gens ST-LS1  
P-anti: das 361 bp Promoterfragment  $\epsilon$ -Cyclase in antisense  
Orientierung.
- 35 7. Fig.7: iPCR Amplifikat, das das 312 bp Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase  
Promotors enthält
8. Fig.8: TAIL PCR Amplifikat, das das 199 bp Fragment des  
 $\epsilon$ -Cyclase Promotors enthält
- 40 9. Fig.9: Nukleotidsequenzvergleich zwischen der publizierten  
Sequenz der *Haematococcus pluvialis* Ketolase (GenBank Acc.-  
No.: X86782) und der im Rahmen der Erfindung bereitgestellten  
Sequenz (vgl. Beispiel 3).

## 56

10. Fig.10: Proteinsequenzvergleich zwischen der publizierten Sequenz der *Haematococcus pluvialis* Ketolase (GenBank Acc.-No.: X86782) und der im Rahmen der Erfindung bereitgestellten Sequenz (vgl. Beispiel 3).
- 5
11. Fig.11: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von  $\epsilon$ -Cyclase dsRNAs.  
AP3P: modifizierter AP3P Promoter (777 bp),  
10 rbcS: rbcS Transitpeptid aus Erbse (206 bp),  
intron: PIV2 Intron des ST-LS1 Gens (SEQ ID NO: 78)  
term: 35S Polyadenylierungssignal von CaMV (762 bp).
12. Fig.12A-C: Sequenzvergleich verschiedener pflanzlicher  $\epsilon$ -Cyclasen.
- 15
- A: GenBank Acc.-No.: AF152246 (524) *Citrus x pardisi* "lycopene cyclase"  
B: GenBank Acc.-No.: AF212130 (165) *Daucus carota* partial ecyclase sequence  
20 C: GenBank Acc.-No.: AF229684 (201) *Daucus carota* partial ecyclase sequence  
D: GenBank Acc.-No.: AF251016 (516) *Tagetes erecta* ecyclase  
E: GenBank Acc.-No.: AF321535 (529) *Adonis palaestina* ecyclase  
25 F: GenBank Acc.-No.: AF321536 (529) *Adonis palaestina* ecyclase  
G: GenBank Acc.-No.: AF321537 (382) *Solanum tuberosum* partial ecyclase sequence  
H: GenBank Acc.-No.: AF321538 (533) *Lactuca sativa* ecyclase  
30 I: GenBank Acc.-No.: AF450280 (262) *Citrus sinensis* ecyclase  
J: GenBank Acc.-No.: AF463497 (517) *Spinacea oleracea* ecyclase  
K: GenBank Acc.-No.: AF486650 (437) *Citrus x pardisi* ecyclase  
35 L: GenBank Acc.-No.: AP003332 (540) Reis ecyclase  
M: GenBank Acc.-No.: AY099485 (525) *Tagetes erecta* ecyclase  
N: GenBank Acc.-No.: L40176 (501) *Arabidopsis* "lycopene cyclase"  
O: GenBank Acc.-No.: NM125085 (524) *Arabidopsis* ecyclase  
40 P: GenBank Acc.-No.: O65837 ecyclase (526) *Tomate*
13. Fig.13: Schematische Darstellung der inverse PCR ("iPCR")  
Für die "iPCR" wird genomische DNA eines Zielorganismus mit der zu isolierenden Promotorsequenz mit einem gegebenen Restriktionsenzym komplett verdaut und anschließend werden in  
45 einem verdünnten Ansatz die einzelnen Fragmente rückligiert, also mit sich selbst zu einem ringförmigen Molekül verbunden.

## 57

In der Vielzahl entstehender ringförmiger DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die die bekannte Sequenz (d.h. die Sequenz kodierend für ein homologes Protein) enthalten. Ausgehend davon kann das ringförmige Molekül mittels PCR amplifiziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem beide Primer sich an den bekannten Sequenzabschnitt anlagern können. Abkürzungen: P - Promotorsequenz; CR - kodierende Region; L - Ligationsstelle; PCR - Polymerasekettenreaktion. Pfeile geben die Bindestelle potentieller Oligonukleotidprimer im Bereich der kodierenden Region wieder.

## Beispiele

## 15 Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet & Voet (1995), 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: Analyse von  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Transkriptspiegeln während der Blütenentwicklung von *Tagetes erecta*

35

Für die Präparation von Total-RNA aus Blättern und Blüten von *Tagetes erecta* wird Pflanzengewebe geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend werden 100 mg des gefrorenen, pulverisierten Pflanzengewebes in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol<sup>®</sup>-Puffer (Life-Technologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wird der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat

(DEPC) bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt.

Die relative Menge an  $\epsilon$ -Cyclase Transkript in Tagetes Blättern und  
5 Blütenstadien wird mittels RNA Gel Blot wie in Sambrook & Russel  
(2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Edition, Cold  
Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York  
Kapitel 7, Protokoll 6) beschrieben, analysiert: Pro Probe werden  
ca. 10 bis 15  $\mu$ g Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel auf-  
10 getrennt. Die relativen Mengen an Gesamt-RNA können anhand der  
mit Ethidiumbromid angefärbten rRNA Banden abgeschätzt werden  
(Fig. 1A). Zur Abschätzung der  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptmengen wird die  
aufgetrennte RNA mittels eines Kapillarblots auf eine Nylonmem-  
bran übertragen.

15

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen  
Sonde wurde das Fragment SEQ ID NO: 47 (gecycl) mittels Poly-  
merasekettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA von Tagetes erecta  
unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (PR16 =  
20 5'-ggcacgaggcaaagcaaagg-3', SEQ ID NO: 48) und eines antisense  
spezifischen Primers (PR22 = 5'-cgataagtgcgacattcaagc-3',  
SEQ ID NO: 49) amplifiziert.

Zur Präparation genomischer DNA aus Tagetes erecta wird Blatt-  
25 material von Tagetes erecta geerntet, in flüssigem Stickstoff  
eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend werden  
100 mg des gefrorenen, pulverisierten Pflanzengewebes in ein  
Reaktionsgefäß überführt, in 0,75 ml Extraktionspuffer auf-  
genommen und für 60 min bei 65°C inkubiert. Der Extraktionspuffer  
30 wird frisch hergestellt aus 25 ml Puffer 1 (0,35 M Sorbitol, 0,1  
M Tris-Base, 5 mM EDTA, pH7.5), 25 ml Puffer 2 (0,2 M Tris-Base,  
0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB), 10 ml 5 % N-Lauroylsarcosine-  
sodium) und 0,24 g Natriumbisulfit. Anschließend an die 65°C-  
Inkubation wird die Suspension mit 0,7 ml Chloroform/Isoamyl-  
35 alkohol (24:1) vermischt, dann 5 min bei 10000 g zentrifugiert.  
Die obere wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß über-  
führt und die Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wie beschrie-  
ben wiederholt. Anschließend wird die obere wässrige Phase in  
ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA durch Zugabe von  
40 1 ml Isopropanol und anschließende Zentrifugation für 5 min bei  
10000 g pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 0,5 ml 75 % Ethanol  
gewaschen, dann getrocknet und anschließend in 0,05 ml sterilem  
Wasser durch 5 minütige Inkubation bei 65°C resuspendiert.

## 59

Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation eines  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Fragmentes aus genomischer DNA aus *Tagetes erecta* sind die folgenden:

5 Die PCR zur Amplifikation eines  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Fragmentes erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten sind:

- 1  $\mu$ g genomische DNA aus *Tagetes erecta*
- 0,25 mM dNTPs
- 10 - 0,2  $\mu$ M Primer PR16 (SEQ ID NO: 48)
- 0,2  $\mu$ M Primer PR22 (SEQ ID NO: 49)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 51°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend ein Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20

Die PCR-Amplifikation mit PR16 und PR22 resultiert in einem 510 bp-Fragment (SEQ ID NO: 47), das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen spezifisch mit der  $\epsilon$ -Cyclase nicht aber mit der Lycopen  $\beta$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* hybridisiert. Das Amplifikationsprodukt wird mit dem NucleonSpin® Extract Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt und für eine radioaktive Markierungsreaktion mit dem Highprime® Kit (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Prähybridisierungs-, Hybridisierungs-, und Waschschriffe werden wie bei

- 25 Sambrook & Russel (2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York Kapitel 6, Protokoll 10) beschrieben durchgeführt. Der letzte Waschschriffe mit 0,1x SSC / 0,1 % SDS bei 65°C bewirkt eine hohe Stringenz der Hybridisierung, die ausreicht, um
- 30 mit der beschriebenen Sonde spezifisch die  $\epsilon$ -Cyclase, nicht aber die Lycopen  $\beta$ -Cyclase, zu detektieren. Die relativen  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel können anhand der Hybridisationssignale, detektiert mithilfe eines Phosphorimagers, abgeschätzt werden. Wie in Fig. 1B ersichtlich liegen unter den gegebenen Versuchs-
- 35 bedingungen  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel in den Blättern unterhalb der Nachweisgrenze, während die gesamte Blütenentwicklung hindurch hohe Mengen an  $\epsilon$ -Cyclase Transkripten nachweisbar sind.
- 40

## 60

Beispiel 2: Klonierung des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des *Tagetes erecta*  $\epsilon$ -Cyclase Promoters kann durch zwei unabhängige Klonierungs-  
5 strategien, Inverse PCR (iPCR; adaptiert Long et al. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu YG et al. (1995) Plant J 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (wie oben beschrieben) aus der *Tagetes erecta*-Linie Orangenprinz isoliert werden.

10

Für den iPCR-Ansatz werden 2  $\mu$ g genomische DNA in einem 25  $\mu$ l Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300  $\mu$ l verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 52) und PR51

15 (SEQ ID NO: 53) wird durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der  $\epsilon$ -Cyclase cDNA (Genbank Acc.-NO.: AF251016), ligiert an 312 bp des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der  $\epsilon$ -Cyclase cDNA enthält (siehe Fig.7).

20

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält; erfolgt  
25 in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1  $\mu$ l Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M Primer PR50 (SEQ ID NO: 52)
- 30 - 0,2  $\mu$ M Primer PR51 (SEQ ID NO: 53)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

35 Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

40 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultiert in einem 734 bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält (Fig. 7). Das Amplifikat, wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den

45 Primern M13 und T7 ergeben für das Amplifikat die Sequenz SEQ ID NO: 50.

## 61

Für den TAIL-PCR Ansatz werden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen genspezifischen Primern („nested primers“) durchgeführt.

5 Die TAIL1-PCR erfolgt in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 100 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,2 mM jedes dNTPs
- 10 - 0,2 µM Primer PR60 (SEQ ID NO: 54)
- 0,2 µM Primermischung AD1
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit sterilem, destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt

15

Die Primermischung AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen

5'-(a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)ggt-3' dar. Der Primer mit  
20 der SEQ ID NO: 57 wurde in dem resultierenden Amplifikat wieder-  
gefunden.

Die PCR-Reaktion TAIL1 werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 - 1 Zyklus mit 93°C für 1 Minute und 95°C für 1 Minute,
- 5 Zyklen mit 94°C für 30 Sekunden, 62°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten,
- 1 Zyklus mit 94°C für 30 Sekunden, 25°C für 3 Minuten, dann ein Temperaturanstieg auf 72°C innerhalb von 3 Minuten,
- 30 72°C für 2,5 Minuten
- 15 Zyklen mit 94°C für 10 Sekunden, 68°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 68°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 29°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten;
- 35 - 1 Zyklus mit 72° für 5 Minuten.

Die TAIL2-PCR erfolgt in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 40 - 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 0,2 µM Primer PR61 (SEQ ID NO: 55)
- 0,2 µM Primer AD1 (SEQ ID NO: 57)
- 45 - 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit sterilem, destilliertem Wasser auf 21 µl aufgefüllt



## 62

Die PCR-Reaktion TAIL2 wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12 Zyklen mit 94°C für 10 Sekunden, 64°C für 1 Minute, 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 64°C für 1 Minute, 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 29°C für 1 Minute, 72°C für 2,5 Minuten;
- 5 - 1 Zyklus mit 72°C für 5 Minuten.

Die TAIL3-PCR erfolgt in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem 10 enthalten ist:

- 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 15 - 0,2 µM Primer PR63 (SEQ ID NO: 56)
- 0,2 µM Primer AD1 (SEQ ID NO: 57)
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit sterilem, destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt

20

Die PCR-Reaktion TAIL3 wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 Zyklen mit 94°C für 15 Sekunden, 29°C für 30 Sekunden, 72°C für 2 Minuten;
- 25 - 1 Zyklus mit 72°C für 5 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultiert in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment 30 der  $\epsilon$ -Cyclase enthält (Fig. 8).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergeben die Sequenz 35 SEQ ID NO: 51. Diese Sequenz ist im Überlappungsbereich identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 50, die mit der iPCR Strategie isoliert wird, und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

40 Der pCR2.1-Klon, der das 734 bp-Fragment (SEQ ID NO: 58), das durch die iPCR-Strategie isoliert wird, enthält, heißt pTA-ecycP und wird für die Herstellung der Expressionskonstrukte verwendet.

## 63

Beispiel 3: Herstellung von transgenen  $\epsilon$ -Cyclase-Expressionskassetten und Expressionsvektoren

Das  $\epsilon$ -Cyclase-Regulationselement ecycP1, enthaltend ein Promoter-5 fragment und die 5'-nicht-translatierte Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*, wird verwendet, um die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) in Tomatenblüten (*Lycopersicon esculentum*) zu exprimieren. Weiterhin wird das  $\epsilon$ -Cyclase-Regulationselement ecycP2, enthaltend ein Promoterfragment, die 5'-nichttranslatierte Region sowie das mutmaßliche Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*, verwendet, zur Expression entweder der  $\beta$ -Glucuronidase oder der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in Plastiden von Tomatenblüten.

Die Herstellung der transgenen Expressionsvektoren pEcycP1:GUS, pEcycP2:GUS, pEcycP2:KETO für die Agrobakterium vermittelte Transformation in *Lycopersicon esculentum* erfolgte unter Verwendung des binären Vektors pS0301 (WO 02/00900). Zur Herstellung der Transformationsplasmide werden die Fragmente ecycP1 und ecycP2 mittels PCR unter Verwendung des Klones pTA-ecycP sowie der Primer OL1 (SEQ ID NO: 59) und OL2 (SEQ ID NO: 60) (für ecycP1) bzw. der Primer OL1 (SEQ ID NO: 59) und OL3 (SEQ ID NO: 61) (für ecycP2) hergestellt.

Die PCR zur Amplifikation eines  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Fragmentes erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 50 ng pTA-ecycP Plasmid
- 0,25 mM dNTPs
- 30 - 0,2  $\mu$ M Primer OL1 (SEQ ID NO: 59)
- 0,2  $\mu$ M Primer OL2 (SEQ ID NO: 60) für ecycP1 bzw. Primer OL3 (SEQ ID NO: 61) für ecycP2
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 35 - 25,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten, 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten, abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit OL1 und OL2 resultiert in einem 456 bp-Fragment (ecycP1, SEQ ID NO: 5), die PCR-Amplifikation mit OL1 und OL3 resultiert in einem 543 bp-Fragment (ecycP2, SEQ ID NO: 6). Die Amplifikate ecycP1 bzw. ecycP2 werden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und die Klone pTA-ecycP1 bzw.

## 64

pTA-ecycP2 erhalten. Sequenzierungen der beiden Klone bestätigen Sequenzen, die im jeweiligen Überlappungsbereich zu SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 58 identisch sind. Diese Klone werden daher für die Ligation in den Transformationsvektor pS0301 (WO 02/00900) verwendet.

Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP1:GUS wird das 454 bp XhoI-NcoI ecycP1 Fragment aus pTA-ecycP1 isoliert und in den XhoI-NcoI geschnittenen Vektor pS0301 ligiert. Der Klon, der das ecycP1-Fragment in der korrekten Orientierung enthält, heißt pEcycP1:GUS (Fig.2, Konstruktkarte).

Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP2:GUS wird das 541 bp XhoI-NcoI ecycP1 Fragment aus pTA-ecycP2 isoliert und in den XhoI-NcoI geschnittenen Vektor pS0301 ligiert. Der Klon, der das ecycP2-Fragment in der korrekten Orientierung enthält, heißt pEcycP2:GUS (Fig.3, Konstruktkarte).

Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP2:KETO wird die Region "GUSI/intron/GUSII/35ST" begrenzt durch eine NcoI- und eine HindIII-Restriktionsschnittstelle in pEcycP2:GUS gegen eine „Ketolase/35S-Terminator“-Region ausgetauscht. Hierzu wird das Plasmid pEcycP2:GUS nach Standardmethoden mit HindIII linearisiert, die dabei entstehenden 5'-Überhänge mit Klenow-Fragment aufgefüllt und abschließend die "GUSI/intron/GUSII/35ST"-Region durch Restriktionsverdau mit NcoI entfernt.

Die „Ketolase/35STerminator“-Region wird hergestellt durch

1. Klonierung einer Ketolase-cDNA, hergestellt mit aus *Haematococcus pluvialis* (Flotow em. Wille) isolierter RNA, gefolgt von
2. Herstellung einer transkriptionellen Ketolase/Terminator-Fusion durch Ligation der Ketolase-Sequenz in den Vektor pJIT117, was dann als Vorlage für
3. die PCR Amplifikation der Ketolase/35S-Terminator Region, dient.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wird mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1,2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0,2 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O,

## 65

0,02 CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; pH 6,8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) angezogen wird, werden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend werden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol<sup>®</sup>-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wird der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt.

15

Für die cDNA-Synthese werden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min. bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads<sup>®</sup>, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen

20 Primers (PR1 SEQ ID NO: 64) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wird mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2; SEQ ID NO: 65) und eines antisense spezifischen Primers (PR1; SEQ ID NO: 64) amplifiziert. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 35 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR1 (SEQ ID NO: 64)
- 0,2 µM Primer PR2 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 40 - 25,8 µl steriles, destilliertes Wasser

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten; 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

45

## 66

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultiert in einem 1155 bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wird das Ketolase-Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy 5 (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigt eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz (Genbank Acc.No.: X86782) unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche werden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Fig. 9 und 10, Sequenzvergleiche). Dieser Klon wird für die Klonierung in den 10 Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res 16: 11380) verwendet. Die weitere Klonierung erfolgt durch Isolierung des 1031 bp SpHI-Fragmentes aus pGKETO2 und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als 20 N-terminale translationale Fusion mit dem rbcs Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

Mittels PCR unter Verwendung von pJKETO2 sowie der Primer OL4 (SEQ ID NO: 62) und OL5 (SEQ ID NO: 63) wird die 1795 bp Ketolase/35S-Terminator-Region hergestellt. Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden: 25

Die PCR zur Amplifikation des OL4-OL5 DNA-Fragmentes, das die kodierende Region der Ketolase gefolgt vom 35S Terminator aus 30 caMV enthält, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 µl pJKETO2 (1 ng Plasmid-DNA)
- 0,25 mM dNTPs
- 35 - 0,2 µM Primer OL4 (SEQ ID NO: 62)
- 0,2 µM Primer OL5 (SEQ ID NO: 63)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

40

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

45

## 67

Die PCR-Amplifikation mit Primer OL4 und OL5 resultiert in einem 1795 bp-Fragment, das die kodierende Region der Ketolase gefolgt vom 35S-Terminator aus CaMV enthält. Dieses 1795 bp Amplifikat wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon "pTA-KETO/5 Term" erhalten. Sequenzierungen des Klones bestätigt eine im jeweiligen Überlappungsbereich zu SEQ ID NO: 66 bzw. pJIT117 identische Sequenz. Dieser Klon wird daher für die Ligation in den Transformationsvektor pEcycP2:GUS (s.o.) verwendet. Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP2:KETO wird das 1791 bp NcoI-EcoRV "KETO/Term"-Fragment aus pTA-KETO/Term isoliert und in den linearisierten Vektor pEcycP2:GUS, enthaltend ein NcoI-5'Überhang und ein Blunt-End, ligiert. Der Klon, der das ecycP2-Fragment in der korrekten Orientierung enthält, heißt 15 pEcycP2:KETO (Fig. 4, Konstruktkarte).

## Beispiel 4: Herstellung und Analyse transgener Tomatenpflanzen

Die Konstrukte pEcycP1:GUS, pEcycP2:GUS und pEcycP2:KETO wurden 20 durch Agrobakterium tumefaciens vermittelte Transformation in Tomate transformiert. Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienen Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wird das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (Murashige & Skoog (1962) 25 Physiol Plant 15,473-497) mit 2 % Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung findet bei 21°C bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen werden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3 % Saccharose 30 mit 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,1 mg/l Naphthalenacetat (NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen werden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgt für drei bis fünf Tage. 35 Anschließend werden die Explantate mit dem Agrobakterium tumefaciens Stamm LBA4404, der das binäre Plasmid mit dem zu transformierenden Gen trägt, wie folgt infiziert: Der Stamm, der über Nacht in YEB Medium mit dem Antibiotikum für das Binärplasmid bei 28°C kultiviert worden ist wird zentrifugiert. Das Bakterien- 40 pellet wird mit flüssigem MS Medium (3 % Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate werden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Explantate 45 mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

## 68

Nach der Co-kultur werden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 mit 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 5 100 µE, Licht/Dunkel-Rhythmus 16h / 8h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse können vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 mit 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen 10 werden ins Gewächshaus überführt.

- Die Transgenizität bewurzelter Tomatenpflanzen wird mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA bestätigt. Das Aktivitätsprofil des  $\epsilon$ -Cyclase-Promoterfragments lässt sich im Fall des ecycP:GUS 15 Konstruktes durch GUS-Assay nach Standardmethoden untersuchen (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907). Das Aktivitätsprofil des  $\epsilon$ -Cyclase-Promoterfragment lässt sich im Fall des Konstruktes pEcycP2:KETO durch Northernblot-Analyse nach Standardmethoden unter Verwendung einer Ketolase-spezifischen 20 Hybridisierungs-sonde oder durch Ketolase-spezifische Realtime-PCR (Sambrook & Russel, 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) untersuchen.
- 25 Beispiel 5: Herstellung eines transgenen Expressionsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz

- Die Expression von invertierten-"Repeat" Transkripten bestehend 30 aus Fragmenten des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors in *Tagetes erecta* erfolgt unter Kontrolle einer modifizierten Version (AP3P) des blüten-spezifischen Promotors AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-NO.: AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125:1711-1721). Das invertierte-"Repeat" 35 Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G et al. (1990) Mol Gen Genet 220:245-50) 40 miteinander verbunden sind.

- Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wird mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) 45 und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 67) und PR10 (SEQ ID NO: 70) hergestellt. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

## 69

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 5 - 1 µl (entsprechend 20 ng) genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd.; hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR7 (SEQ ID NO: 67)
- 10 - 0,2 µM Primer PR10 (SEQ ID NO: 70)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

15 Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20 Das 922 bp Amplifikat wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigt eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz GenBank Acc.-No.: AL132971)

25 und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz GenBank Acc.-No.: AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (GenBank Acc.-No.: AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede können in einem unab-

30 hängigen Amplifikationsexperiment reproduziert werden und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wird mittels rekombinanter PCR  
35 unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wird mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 67) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 69) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 68) und PR10 (SEQ ID NO: 70) amplifiziert (Amplifikat A8/10). Die PCR-  
40 Bedingungen sind die folgenden:



## 70

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgt in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten ist:

5

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR7 (SEQ ID NO: 67) bzw.  
Primer PR8 (SEQ ID NO: 68)
- 10 - 0,2 µM Primer PR9 (SEQ ID NO: 69) bzw.  
Primer PR10 (SEQ ID NO: 70)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

15

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des

- 25 AP3 Promoters (AP3P) in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgt in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

30

- 0,5 µg A7/9
- 0,25 µg A8/10

- Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30) erfolgt in einem 20 µl  
35 Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 40 - 2 µl 1 X Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

- Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wird mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen  
45 Primers (PR7 SEQ ID NO: 67) und eines antisense spezifischen

## 71

Primers (PR10 SEQ ID NO: 70) amplifiziert. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 10 - 0,2 µM Primer PR7 (SEQ ID NO: 67)
- 0,2 µM Primer PR10 (SEQ ID NO: 70)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

15

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20

Die PCR-Amplifikation mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 67) und PR10 (SEQ ID NO: 70) resultiert in einem 777 bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert (SEQ ID NO: 77).

Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen)

25 kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz GenBank Acc.-No.: AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert ist. Dieser Klon wird für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids

30 Res 16:11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgt durch Isolierung des 775 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P

35 anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wird mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220:245-250) sowie der

40 Primer PR40 (SEQ ID NO: 71) und PR41 (SEQ ID NO: 72) hergestellt. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

45

## 72

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 5 - 50 ng p35SGUS INT
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR40 (SEQ ID NO: 71)
- 0,2 µM Primer PR41 (SEQ ID NO: 72)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute,
- 15 53°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultiert in einem 212 bp-Fragment (SEQ ID NO: 78). Unter Verwendung von Standard-

- 20 methoden wird das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigt eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT. Dieser Klon wird für die
- 25 Klonierung in den Vektor pJAP3P (s.o.) eingesetzt. Die Klonierung erfolgt durch Isolierung des 210 bp SalI-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3' Ende des
- 30 rbcS Transitpeptides enthält, heißt pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

- Beispiel 6: Herstellung von invertierten-"Repeat"-Expressions-
- 35 kassetten für die blütenspezifische Expression von  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor dsRNAs in *Tagetes erecta*

Die Expression von invertierten-"Repeat" Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der  $\epsilon$ -Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte

- 40 unter Kontrolle einer modifizierten Version (AP3P) des blüten-spezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 5) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank Acc.-No. AF099501). Das invertierte-"Repeat" Transkript enthält jeweils ein  $\epsilon$ -Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-
- 45 Fragment) und ein sequenzidentisches  $\epsilon$ -Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch

## 73

ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 5) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente werden mittels PCR unter Verwendung von 5 Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 2) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 73) und PR126 (SEQ ID NO: 75) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 74) und PR127 (SEQ ID NO: 76) hergestellt. Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

10 Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält, erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1  $\mu$ l pTA-ecycP (10 ng/ $\mu$ l; siehe Beispiel 2)
- 15 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M Primer PR124 (SEQ ID NO: 73)
- 0,2  $\mu$ M Primer PR126 (SEQ ID NO: 75)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagen)
- 0,25  $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagen)
- 20 - 28,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält, erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 25 - 1  $\mu$ l pTA-ecycP (10 ng/ $\mu$ l; siehe Beispiel 2)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M Primer PR125 (SEQ ID NO: 74)
- 0,2  $\mu$ M Primer PR127 (SEQ ID NO: 76)
- 30 - 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagen)
- 0,25  $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagen)
- 28,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen 35 durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultiert in 40 einem 358 bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Frag- 45 ment, werden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigen jeweils eine

## 74

Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 58. Diese Klone werden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 5) verwendet.

5

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 356 bp PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der das  $\epsilon$ -Cyclase Promoter-

- 10 fragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt. Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 359 bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-  
15 BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das  $\epsilon$ -Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters.

20

Für die Herstellung einer invertierten-"Repeat" Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wird ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5'

- 25 (SEQ ID NO 82) und PRCHRC3' (SEQ ID NO: 83) amplifiziert. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigen eine zur Sequenz GenBank Acc.-No.: AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wird daher  
30 für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet. Die Klonierung erfolgt durch Isolierung des 1535 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heißt cs45.

35

Die Herstellung der Transformationsplasmide für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgt unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

40

Zur Herstellung des Transformationsplasmides pS5AI7 wird das 1683 bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Fig. 5, Konstruktkarte).

45

## 75

Zur Herstellung des Transformationsplasmides pS5CI7 wird das 2448 bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Fig.6, Konstruktkarte).

## 5 Beispiel 7: Herstellung und Analyse transgener Tagetespflanzen

Die Transformationsplasmides pS5AI7 und pS5CI7 werden durch Agrobakterium tumefaciens vermittelte Transformation in Tagetes transformiert.

10

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige & Skoog (1962) Physiol Plant 15:473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C / 20 bis 200 µE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis 8 Wochen.

15

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS - Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

20

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarker (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird, über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand.

30

35

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL)) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem

40

45

## 76

Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$ , Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 5 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für 10 diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar. Nach jeweils 15 ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 20 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $\text{GA}_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

25

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive 30 Regeneration wie oben beschrieben.

35

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

40

- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

45

- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

## 77

- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

5

Die Transgenizität bewurzelter Sprosse kann anhand isolierter genomischer DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht werden. Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Transkriptmengen (im Vergleich mit dem zur Transformation verwendeten Wildtyp)

- 10 infolge Transformation mit dem Transformationsplasmid pS5AI7 oder pS5CI7 kann untersucht werden durch Northernblotanalyse nach Standardmethoden (Sambrook & Russel, 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) unter Verwendung einer
- 15  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Hybridisierungssonde, beispielsweise wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Weiterhin kann die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Transkriptmengen (im Vergleich mit dem zur Transformation verwendeten Wildtyp) mittels  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischer Realtime PCR untersucht werden.

20

25

30

35

40

45



Transgene Expressionskassetten zur Expression von Nukleinsäuren  
in der pflanzlichen Blüte

## 5 Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen  
Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte,  
sowie transgene Expressionskassetten und Expressionsvektoren,  
10 die Promotoren mit einer Expressionsspezifität für die pflanz-  
liche Blüte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen  
transgenen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren trans-  
formierte Organismen (bevorzugt Pflanzen), davon abgeleitete  
Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung der-  
15 selben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut,  
Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

20

25

30

35

40

45

## 1

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co. KGaA

<120> Transgene Expressionskassetten zur Expression von  
Nukleinsäuren in der pflanzlichen Blüte

<130> AE20020666

<140>

<141>

<160> 83

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 312

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(312)

<400> 1

```
cgatagtaaa atcgttagtt atgattaata cttgggaggt gggggattat aggctttggt 60
gtgagaatgt tgagaaagag gtttgacaaa tcggtgtttg aatgaggtta aatggagttt 120
aattaaaata aagagaagag aaagattaag aggggtgatgg ggatattaaa gacggscaat 180
atagtgatgc cacgtagaaa aaggtaagtg aaaacataca acgtggcttt aaaagatggc 240
ttggctgcta atcaactcaa ctcaactcat atcctatcca ttcaaattca attcaattct 300
attgaatgca aa 312
```

<210> 2

<211> 447

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(312)

<220>

<221> 5'UTR

<222> (313)..(444)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (445)..(447)

<223> ATG-start codon

<400> 2

```
cgatagtaaa atcgttagtt atgattaata cttgggaggt gggggattat aggctttggt 60
gtgagaatgt tgagaaagag gtttgacaaa tcggtgtttg aatgaggtta aatggagttt 120
aattaaaata aagagaagag aaagattaag aggggtgatgg ggatattaaa gacggscaat 180
atagtgatgc cacgtagaaa aaggtaagtg aaaacataca acgtggcttt aaaagatggc 240
ttggctgcta atcaactcaa ctcaactcat atcctatcca ttcaaattca attcaattct 300
attgaatgca aagcaaagca aaggttgttt gttgttggtt ttgagagaca ctccaatcca 360
aacagatata aggcgtgact ggatatttct ctctcgttcc taacaacagc aacgaagaag 420
aaaaagaatc attactaaca atcaatg 447
```

<210> 3

<211> 537

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(312)

2

<220>  
<221> 5'UTR  
<222> (313)..(444)  
<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (445)..(537)  
<220>  
<221> CDS  
<222> (445)..(537)  
<223> coding for transit peptide of epsilon cyclase  
<400> 3  
cgatagtaaa atcgttagtt atgattaata cttgggaggt gggggattat aggctttggt 60  
gtgagaatgt tgagaaagag gtttgacaaa tcggtgttg aatgagggtta aatggagttt 120  
aattaaaata aagagaagag aaagattaag aggggtgatgg ggatattaaa gacggscaat 180  
atagtgatgc cacgtagaaa aaggtaagtg aaaacataca acgtggctttt aaaagatggc 240  
ttggctgcta atcaactcaa ctcaactcat atcctatcca ttcaaattca attcaattct 300  
attgaatgca aagcaaagca aagggtgttt gttgttggtg ttgagagaca ctccaatcca 360  
aacagataca aggcgtgact ggatatttct ctctcgttcc taacaacagc aacgaagaag 420  
aaaaagaatc attactaaca atca atg agt atg aga gct gga cac atg acg 471  
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr  
1 5  
gca aca atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga 519  
Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg  
10 15 20 25  
tac acg aag caa att aag 537  
Tyr Thr Lys Gln Ile Lys  
30  
<210> 4  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Tagetes erecta  
<400> 4  
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
1 5 10 15  
Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys  
20 25 30  
<210> 5  
<211> 456  
<212> DNA  
<213> Tagetes erecta  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(6)  
<223> restriction site  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (451)..(456)  
<223> restriction site

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (7)..(450)

&lt;223&gt; coding for promoter and 5'-UTR region

&lt;400&gt; 5

```
ctcgagagta aaatcggttag ttatgattaa tacttgggag gtggggggatt ataggctttg 60
ttgtgagaat gttgagaaa aggtttgaca aatcggtggt tgaatgaggt taaatggagt 120
ttaattaaaa taaagagaag agaaagatta agagggtgat ggggatatta aagacggsca 180
atatagtgat gccacgtaga aaaaggtaag tgaaaacata caacgtggct ttaaaagatg 240
gcttggctgc taatcaactc aactcaactc atatcctatc cattcaaatt caattcaatt 300
ctattgaatg caaagcaaag caaaggttgt ttgttgttgt tgttgagaga cactccaatc 360
caaacagata caaggcgtga ctggatattt ctctctcggt cctaacaaca gcaacgaaga 420
agaaaaagaa tcattactaa caatcaatgg ccatgg 456
```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 543

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(6)

&lt;223&gt; restriction site

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (538)..(543)

&lt;223&gt; restriction site

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (7)..(542)

<223> coding for promoter - 5'-UTR - signal peptide  
region

&lt;400&gt; 6

```
ctcgagagta aaatcggttag ttatgattaa tacttgggag gtggggggatt ataggctttg 60
ttgtgagaat gttgagaaa aggtttgaca aatcggtggt tgaatgaggt taaatggagt 120
ttaattaaaa taaagagaag agaaagatta agagggtgat ggggatatta aagacggsca 180
atatagtgat gccacgtaga aaaaggtaag tgaaaacata caacgtggct ttaaaagatg 240
gcttggctgc taatcaactc aactcaactc atatcctatc cattcaaatt caattcaatt 300
ctattgaatg caaagcaaag caaaggttgt ttgttgttgt tgttgagaga cactccaatc 360
caaacagata caaggcgtga ctggatattt ctctctcggt cctaacaaca gcaacgaaga 420
agaaaaagaa tcattactaa caatcaatga gtatgagagc tggacacatg acggcaacaa 480
tggcggcctt tacatgccct aggtttatga ctagcatcag atacacgaag caaattacca 540
tgg 543
```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1008

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 7

```
gaagatgtcg tggacagtta cctagtagaa agccctgaaa ctacgatgt cactgacttc 60
tgcagcttct acactctccc ttcaaccatc ctcggttaacc cgaactacac tacattgaaa 120
gctgcgtatt cttactacaa tgtggccaca cagacctcgt ttcttcagct gatgaatgat 180
gcgctaattg tctcaaagca aaagggtttc gatgtgttca acgcgttgga tgtgatgcac 240
aatgagagt tcttgaaaaga actgaagttt gggccaggag atggacaact tcattactat 300
ctctacaatt accgttttgaa aagtgccttg aagccagcgg aactcgggct tgttctctta 360
taagctcaac aacttgattt gatggtatca acaaacttga aatttgtctc tctttttttt 420
tcttcagtct gaactacttc tcccatgggt tactgaaact gagtttaatt attttggcaa 480
```

4

```

tgcaatttttg gatttttgctt ttagtttcac ttgtgtttctc tgagagagtt gaccctgaga 540
agtaaagtca acactagacg tgtgcgagtt tcaatggact gcatttttag gtccaagaag 600
tagctacggc ccatctatcg tagaagttgt tttttgtact aaagcctgtt atagccgaac 660
taggtcgcta cgtttcctaa cttgtcgttt attaggctac ttttaaactg cacgcaccaa 720
tccagttctt acacgcgttt tcacaaaaag gacettacat gggttgttcc cccaataaga 780
aaattacacg ttgcagaatc gaagcagtgg tctatccttg ttatcgctct ctcgtcttta 840
tggctcttcc aagtcatttt gagaaatttt cgattttgag atttttttcc aaatattaca 900
aaaggaaata attagattcc tctttctgct tgctatacct tgatagaaca atataacaat 960
gggtgaagtc ttctcgctgt attcgaaatt atttggagga ggaaaatg 1008

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1169

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 8

```

agaaggagag agagccggcc ggcgcgacgg cgggtggcagg agaggtggag agagcccgcc 60
gacgcgacgg cggcagtggg agaaaaggag aggaggcggc cggcgctgtc gaacgcgcac 120
gggaagcagc ggacgatgcc gagcaggaca atgtcctcct cgtcaccacc ttcctcatcg 180
tcgtcgcggt cgggtgggtgc cgggcgagac ggttttttag ggaggggtcg gcggcggcg 240
agcccatccg agctcgcttg gcttgcgcga gcccgccctc gctgcagctt ggtgtgctgg 300
ggacgacgac gaggaaaggg ggagagagga atcaactacc gacgacagcg gaggcgggcg 360
agcgcggtgc cgggctgtct acgctcgccg accaggccct cgtcccgta cactcgctcg 420
cctccgttcc acccgagcc cgcgcgcgtc cgttcgcagc gctcgcccgt cgccgctccg 480
ctgctgtgca gtcccgccgc cgcgctcgcc ctgactgaag aagaaaagag agaagagaga 540
aaagagaagg gaaggagaag aaaatagaag aaaaaatat gtgcagctga tgtatgagcc 600
ccacatactc ttttttaate ttttttgctg actacgatgc cacgtcagcg aaaccaccta 660
tatatactac cataggatct tgagtgcacg gtttatatga gtttaggagt atacattttt 720
agttttatgg ttaagggatc ataaaaaatt ctcgctatta agttgagtga cgcgcagtga 780
acttattact caaacttaac agcgtttgat ccattcacat ccggcccata gcagcccata 840
tccagcaacg caccacggtg actgacacgc ggggcccac gaggtggcgc cgtggctggt 900
ggggcggggt agtcacgccc tcggcgctgc cccaaaagc gaaccatata ctttgcttcg 960
tggggccctg cccaatcgcc gcccgccacg tgccccttcc cggataccgc ctccctccaa 1020
acccgctccc tctccctctc cctcctccta caatggccgc agcagcagca gccagcagca 1080
gacgcagaga ccagtagctt tcgcagaggg ggcagccacc accgctcct cctcctcctc 1140
ctcatccgac ggtgtgcaac caagcgatg 1169

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1830

&lt;212&gt; DNA

<213> *Tagetes erecta*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (141)..(1688)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 9

```

ggcacgaggg aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgttga gagacactcc aatccaaaca 60
gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120
agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
1 5 10
atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr
15 20 25
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln
30 35 40

```

5

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg	317
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu	
45 50 55	
ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc	365
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser	
60 65 70 75	
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt	413
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser	
80 85 90	
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt	461
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu	
95 100 105	
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc	509
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile	
110 115 120	
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa	557
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu	
125 130 135	
ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat	605
Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp	
140 145 150 155	
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc	653
Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala	
160 165 170	
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701
Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg	
175 180 185	
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749
Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile	
190 195 200	
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797
Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile	
205 210 215	
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845
Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly	
220 225 230 235	
aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
240 245 250	
gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
255 260 265	
cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
270 275 280	
tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
285 290 295	
cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
300 305 310 315	

6

```

atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act 1133
Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr
                320                325                330

atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att 1181
Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile
                335                340                345

cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt 1229
Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe
                350                355                360

ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta 1277
Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val
                365                370                375

aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att 1325
Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile
                380                385                390                395

tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca 1373
Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr
                400                405                410

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421
Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg
                415                420                425

aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469
Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln
                430                435                440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517
Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu
                445                450                455

ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565
Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr
                460                465                470                475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser
                480                485                490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661
Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly
                495                500                505

aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taaataactc tagtcgcgat 1708
Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile
                510                515

cagtttagat tataggcaca tcttgcatat atatatgtat aaaccttatg tgtgctgtat 1768
ccttacatca acacagtcac taattgtatt tcttggggta atgctgatga agtattttct 1828
gg 1830

<210> 10
<211> 516
<212> PRT
<213> Tagetes erecta

<400> 10
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
  1                5                10                15
Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys
  20                25                30

```

7

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
35 40 45  
Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
50 55 60  
Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
65 70 75 80  
Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
85 90 95  
Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
100 105 110  
Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
115 120 125  
Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
130 135 140  
Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
145 150 155 160  
Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
165 170 175  
Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
180 185 190  
Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
195 200 205  
Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
210 215 220  
Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
225 230 235 240  
Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
245 250 255  
Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
260 265 270  
Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
275 280 285  
Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
290 295 300  
Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
305 310 315 320  
Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
325 330 335  
Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
340 345 350  
Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
355 360 365  
Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
370 375 380  
Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
385 390 395 400  
Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
405 410 415



8

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430  
 Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445  
 Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460  
 Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480  
 Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495  
 Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510  
 Tyr Leu Thr Ile  
 515

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1916

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (173)..(1747)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 11

attcaaattc aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg 60  
 ttgtttgttg agagacactc caatccaaac agatacaagg cgtgactgga tttttctctc 120  
 tcgttcctta acaacagcaa cgaagaagaa aaagaatcat tactcacaat ca atg agt 178  
 Met Ser  
 1

atg aga gct gga cac atg acg gca aca atg gcg gct ttt aca tgc cct 226  
 Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro  
 5 10 15

agg ttt atg act agc atc aga tac acg aag caa att aag tgc aac gct 274  
 Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala  
 20 25 30

gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa gag att gag gag gaa gaa gat 322  
 Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp  
 35 40 45 50

tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg ctt ttt gtt caa atg caa cag 370  
 Tyr Val Lys Ala Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met Gln Gln  
 55 60 65

aat aag tcc atg gat gca cag tct agc cta tcc caa aag ctc cca agg 418  
 Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg  
 70 75 80

gta cca ata gga gga gga gga gac agt aac tgt ata ctg gat ttg gtt 466  
 Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val  
 85 90 95

gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt gct ctt gct gga gaa tca gcc 514  
 Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala  
 100 105 110

9

aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc ggc cct gat ctt cct ttt aca	562
Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr	
115 120 125 130	
aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa ttt ata ggt ctt gga ctt gag	610
Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu	
135 140 145	
ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat act gta gta tat ctt gat gac	658
Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp	
150 155 160	
aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc tat gga cga gtt agt cgt gat	706
Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp	
165 170 175	
tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg tgc atg gag tca ggc gtt tca	754
Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly Val Ser	
180 185 190	
tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att act gaa gct cca aat ggc cta	802
Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu	
195 200 205 210	
agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc aca att cca tgc agg ctt gct	850
Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala	
215 220 225	
act gtc gct tct gga gca gct tct ggg aaa ctt ttg cag tat gaa ctt	898
Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu	
230 235 240	
ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca gct tat ggt tac gag gtt gag	946
Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Tyr Glu Val Glu	
245 250 255	
gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc cta atg gtt ttc atg gat tat	994
Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr	
260 265 270	
aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa tca cta gaa gca caa tat cca	1042
Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro	
275 280 285 290	
aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct cca act aaa gta ttc ttt gag	1090
Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu	
295 300 305	
gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc atg cct ttt gag tta ttg aag	1138
Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys	
310 315 320	
aca aaa ctc atg tca aga tta aag act atg ggg atc cga ata acc aaa	1186
Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys	
325 330 335	
act tat gaa gag tat ctt gtt gct tgt caa tat ttg gaa gaa tgg tca	1234
Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Val Ala Cys Gln Tyr Leu Glu Glu Trp Ser	
340 345 350	
tat att cca gta ggt gga tcc ctt cca aat acc gag caa aag aac ctt	1282
Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu	
355 360 365 370	
gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg	1330
Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser	
375 380 385	

## 10

gtt gta aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca 1378  
 Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala  
 390 395 400

aag att tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat ctt gga aga 1426  
 Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp Leu Gly Arg  
 405 410 415

tac aca acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt 1474  
 Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu  
 420 425 430

gaa agg aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att 1522  
 Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile  
 435 440 445 450

gtc cag atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc 1570  
 Val Gln Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe  
 455 460 465

cgc ttg ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca 1618  
 Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser  
 470 475 480

tca act gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg 1666  
 Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro  
 485 490 495

cat agc ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca 1714  
 His Ser Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr  
 500 505 510

gga gga aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taaataactc tagtcgcgat 1767  
 Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 515 520 525

cagtttagat tataggcaca tcttgcatat atatatgtat aaaccttatg tgtgctgtat 1827  
 ccttacatca acacagtcac taattgtatt tcttggggta atgctgatga agtattttct 1887  
 ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1916

<210> 12  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Tagetes erecta

<400> 12  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30  
 Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45  
 Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 50 55 60  
 Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
 85 90 95  
 Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
 100 105 110

## 11

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
115 120 125

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
180 185 190

Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Tyr Glu  
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Val Ala Cys Gln Tyr Leu Glu Glu  
340 345 350

Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys  
355 360 365

Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly  
370 375 380

Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val  
385 390 395 400

Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp Leu  
405 410 415

Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp  
420 425 430

Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala  
435 440 445

Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr  
450 455 460

Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser  
465 470 475 480

Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile  
485 490 495

## 12

Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp  
                   500                                  505                                  510  
 Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
                   515                                  520                                  525

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1818

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (104)..(1675)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 13

```

aggaaataat tagattcctc tttctgcttg ctataccttg atagaacaat ataacaatgg 60
tgtaagtctt ctcgctgtat tcgaaattat ttggaggagg aaa atg gag tgt gtt 115
                                   Met Glu Cys Val
                                   1
ggg gct agg aat ttc gca gca atg gcg gtt tca aca ttt ccg tca tgg 163
Gly Ala Arg Asn Phe Ala Ala Met Ala Val Ser Thr Phe Pro Ser Trp
   5                10                15                20
agt tgt cga agg aaa ttt cca gtg gtt aag aga tac agc tat agg aat 211
Ser Cys Arg Arg Lys Phe Pro Val Val Lys Arg Tyr Ser Tyr Arg Asn
                25                30                35
att cgt ttc ggt ttg tgt agt gtc aga gct agc ggc ggc gga agt tcc 259
Ile Arg Phe Gly Leu Cys Ser Val Arg Ala Ser Gly Gly Gly Ser Ser
                40                45                50
ggg agt gag agt tgt gta gcg gtg aga gaa gat ttc gct gac gaa gaa 307
Gly Ser Glu Ser Cys Val Ala Val Arg Glu Asp Phe Ala Asp Glu Glu
                55                60                65
gat ttt gtg aaa gct ggt ggt tct gag att cta ttt gtt caa atg cag 355
Asp Phe Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Ile Leu Phe Val Gln Met Gln
                70                75                80
cag aac aaa gat atg gat gaa cag tct aag ctt gtt gat aag ttg cct 403
Gln Asn Lys Asp Met Asp Glu Gln Ser Lys Leu Val Asp Lys Leu Pro
   85                90                95                100
cct ata tca att ggt gat ggt gct ttg gat cta gtg gtt att ggt tgt 451
Pro Ile Ser Ile Gly Asp Gly Ala Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys
                105                110                115
ggg cct gct ggt tta gcc ttg gct gca gaa tca gct aag ctt gga tta 499
Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu
                120                125                130
aaa gtt gga ctc att ggt cca gat ctt cct ttt act aac aat tac ggt 547
Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly
                135                140                145
gtt tgg gaa gat gaa ttc aat gat ctt ggg ctg caa aaa tgt att gag 595
Val Trp Glu Asp Glu Phe Asn Asp Leu Gly Leu Gln Lys Cys Ile Glu
                150                155                160
cat gtt tgg aga gag act att gtg tat ctg gat gat gac aag cct att 643
His Val Trp Arg Glu Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Lys Pro Ile
   165                170                175                180

```

## 13

acc att ggc cgt gct tat gga aga gtt agt cga cgt ttg ctc cat gag	691
Thr Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg Arg Leu Leu His Glu	
185 190 195	
gag ctt ttg agg agg tgt gtc gag tca ggt gtc tcg tac ctt agc tcg	739
Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser	
200 205 210	
aaa gtt gac agc ata aca gaa gct tct gat ggc ctt aga ctt gtt gct	787
Lys Val Asp Ser Ile Thr Glu Ala Ser Asp Gly Leu Arg Leu Val Ala	
215 220 225	
tgt gac gac aat aac gtc att ccc tgc agg ctt gcc act gtt gct tct	835
Cys Asp Asp Asn Asn Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser	
230 235 240	
gga gca gct tcg gga aag ctc ttg caa tac gaa gtt ggt gga cct aga	883
Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg	
245 250 255 260	
gtc tgt gtg caa act gca tac ggc gtg gag gtt gag gtg gaa aat agt	931
Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Ser	
265 270 275	
cca tat gat cca gat caa atg gtt ttc atg gat tac aga gat tat act	979
Pro Tyr Asp Pro Asp Gln Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr	
280 285 290	
aac gag aaa gtt cgg agc tta gaa gct gag tat cca acg ttt ctg tac	1027
Asn Glu Lys Val Arg Ser Leu Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr	
295 300 305	
gcc atg cct atg aca aag tca aga ctc ttc ttc gag gag aca tgt ttg	1075
Ala Met Pro Met Thr Lys Ser Arg Leu Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu	
310 315 320	
gcc tca aaa gat gtc atg ccc ttt gat ttg cta aaa acg aag ctc atg	1123
Ala Ser Lys Asp Val Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met	
325 330 335 340	
tta aga tta gat aca ctc gga att cga att cta aag act tac gaa gag	1171
Leu Arg Leu Asp Thr Leu Gly Ile Arg Ile Leu Lys Thr Tyr Glu Glu	
345 350 355	
gag tgg tcc tat atc cca gtt ggt ggt tcc ttg cca aac acc gaa caa	1219
Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln	
360 365 370	
aag aat ctc gcc ttt ggt gct gcc gct agc atg gta cat ccc gca aca	1267
Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr	
375 380 385	
ggc tat tca gtt gtg aga tct ttg tct gaa gct cca aaa tat gca tca	1315
Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr Ala Ser	
390 395 400	
gtc atc gca gag ata cta aga gaa gag act acc aaa cag atc aac agt	1363
Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Glu Glu Thr Thr Lys Gln Ile Asn Ser	
405 410 415 420	
aat att tca aga caa gct tgg gat act tta tgg cca cca gaa agg aaa	1411
Asn Ile Ser Arg Gln Ala Trp Asp Thr Leu Trp Pro Pro Glu Arg Lys	
425 430 435	
aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt ggt ctt gca ctc ata gtt caa ttc	1459
Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Phe	
440 445 450	

## 14

gat acc gaa ggc att aga agc ttc ttc cgt act ttc ttc cgc ctt cca 1507  
Asp Thr Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro  
455 460 465

aaa tgg atg tgg caa ggg ttt cta gga tca aca tta aca tca gga gat 1555  
Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser Thr Leu Thr Ser Gly Asp  
470 475 480

ctc gtt ctc ttt gct tta tac atg ttc gtc att tca cca aac aat ttg 1603  
Leu Val Leu Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ser Pro Asn Asn Leu  
485 490 495 500

aga aaa ggt ctc atc aat cat ctc atc tct gat cca acc gga gca acc 1651  
Arg Lys Gly Leu Ile Asn His Leu Ile Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr  
505 510 515

atg ata aaa acc tat ctc aaa gta tgatttactt atcaactctt aggttttgtt 1705  
Met Ile Lys Thr Tyr Leu Lys Val  
520

atatatatgt tgatttatct gaataatcga tcaaagaatg gtatgtgggt tactaggaag 1765  
ttggaaacaa acatgtatag aatctaagga gtgatcgaaa tggagatgga aac 1818

<210> 14  
<211> 524  
<212> PRT  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14  
Met Glu Cys Val Gly Ala Arg Asn Phe Ala Ala Met Ala Val Ser Thr  
1 5 10 15  
Phe Pro Ser Trp Ser Cys Arg Arg Lys Phe Pro Val Val Lys Arg Tyr  
20 25 30  
Ser Tyr Arg Asn Ile Arg Phe Gly Leu Cys Ser Val Arg Ala Ser Gly  
35 40 45  
Gly Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ser Cys Val Ala Val Arg Glu Asp Phe  
50 55 60  
Ala Asp Glu Glu Asp Phe Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Ile Leu Phe  
65 70 75 80  
Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Asp Met Asp Glu Gln Ser Lys Leu Val  
85 90 95  
Asp Lys Leu Pro Pro Ile Ser Ile Gly Asp Gly Ala Leu Asp Leu Val  
100 105 110  
Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala  
115 120 125  
Lys Leu Gly Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr  
130 135 140  
Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Asn Asp Leu Gly Leu Gln  
145 150 155 160  
Lys Cys Ile Glu His Val Trp Arg Glu Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp  
165 170 175  
Asp Lys Pro Ile Thr Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg Arg  
180 185 190  
Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser  
195 200 205

## 15

Tyr Leu Ser Ser Lys Val Asp Ser Ile Thr Glu Ala Ser Asp Gly Leu  
210 215 220  
Arg Leu Val Ala Cys Asp Asp Asn Asn Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala  
225 230 235 240  
Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val  
245 250 255  
Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu  
260 265 270  
Val Glu Asn Ser Pro Tyr Asp Pro Asp Gln Met Val Phe Met Asp Tyr  
275 280 285  
Arg Asp Tyr Thr Asn Glu Lys Val Arg Ser Leu Glu Ala Glu Tyr Pro  
290 295 300  
Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Met Thr Lys Ser Arg Leu Phe Phe Glu  
305 310 315 320  
Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Val Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys  
325 330 335  
Thr Lys Leu Met Leu Arg Leu Asp Thr Leu Gly Ile Arg Ile Leu Lys  
340 345 350  
Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro  
355 360 365  
Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val  
370 375 380  
His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro  
385 390 395 400  
Lys Tyr Ala Ser Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Glu Glu Thr Thr Lys  
405 410 415  
Gln Ile Asn Ser Asn Ile Ser Arg Gln Ala Trp Asp Thr Leu Trp Pro  
420 425 430  
Pro Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu  
435 440 445  
Ile Val Gln Phe Asp Thr Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg Thr Phe  
450 455 460  
Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser Thr Leu  
465 470 475 480  
Thr Ser Gly Asp Leu Val Leu Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ser  
485 490 495  
Pro Asn Asn Leu Arg Lys Gly Leu Ile Asn His Leu Ile Ser Asp Pro  
500 505 510  
Thr Gly Ala Thr Met Ile Lys Thr Tyr Leu Lys Val  
515 520

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1623

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1620)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase



## 16

&lt;400&gt; 15

atg gag ttc tcc ggc ggc gcg acc gtg tcg gcg ccg ttc ggt tgc tgc	48
Met Glu Phe Ser Gly Gly Ala Thr Val Ser Ala Pro Phe Gly Cys Cys	
1 5 10 15	
cgt gcg gcg tgg ggc gcc gcg gcg gcg ggt gcg ggg gcg gag gga agg	96
Arg Ala Ala Trp Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Glu Gly Arg	
20 25 30	
agc agg agg gtt gtg ccg cgc gcg gtg gag ccg cgg cgg cgc ggg cgg	144
Ser Arg Arg Val Val Pro Arg Ala Val Glu Pro Arg Arg Arg Gly Arg	
35 40 45	
tgg atg gtg agg tgc gtg gcg acg gag aag cac aag gac gcg gcg gcg	192
Trp Met Val Arg Cys Val Ala Thr Glu Lys His Lys Asp Ala Ala Ala	
50 55 60	
cgg cgc ggc ggc gtg gag gtg gag ttc gcc gac gag gag gac tac gtc	240
Arg Arg Gly Gly Val Glu Val Glu Phe Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val	
65 70 75 80	
aag ggc ggc ggc ggc gag ctt ctc tac gtg caa atg cag gcg tcc aag	288
Lys Gly Gly Gly Gly Glu Leu Leu Tyr Val Gln Met Gln Ala Ser Lys	
85 90 95	
tcc atg gac agc cag tcc aag atc tcc tcc aag ctg ctg ccc ata ccc	336
Ser Met Asp Ser Gln Ser Lys Ile Ser Ser Lys Leu Leu Pro Ile Pro	
100 105 110	
gat gaa aat tca gtt ctt gat ttg gtc atc att ggc tgc ggt cca gct	384
Asp Glu Asn Ser Val Leu Asp Leu Val Ile Ile Gly Cys Gly Pro Ala	
115 120 125	
ggc tta tcc cta gca gca gag tca gct aag aaa ggg ctc aat gtt ggt	432
Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Lys Gly Leu Asn Val Gly	
130 135 140	
ctc att ggc cct gat ctt cca ttc acg aac aac tac ggt gtg tgg gag	480
Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu	
145 150 155 160	
gat gaa ttc aaa gac ctg ggc ctg gag agc tgc att gaa cat gtc tgg	528
Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Ser Cys Ile Glu His Val Trp	
165 170 175	
aag gat act atc gtg tac cta gac ggt aac aag cca ata atg att ggc	576
Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Asn Lys Pro Ile Met Ile Gly	
180 185 190	
cgt gcg tat ggc agg gtt cac agg gac ttg ctg cac gag gag ttg ctg	624
Arg Ala Tyr Gly Arg Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu	
195 200 205	
aga cga tgc tat gac gct ggc gtc aca tac ctc agc tcg aag gtg gac	672
Arg Arg Cys Tyr Asp Ala Gly Val Thr Tyr Leu Ser Ser Lys Val Asp	
210 215 220	
aag atc atg gaa tct cct gat gga cat cgg gta gtc tgt tgt gaa ggg	720
Lys Ile Met Glu Ser Pro Asp Gly His Arg Val Val Cys Cys Glu Gly	
225 230 235 240	
gat cgt gag gta ctt tgc agg ctt gcc att gtt gca tct ggg gca gca	768
Asp Arg Glu Val Leu Cys Arg Leu Ala Ile Val Ala Ser Gly Ala Ala	
245 250 255	
tct ggt agg ctt cta gag tac gag gtt ggt ggt ccg cgt gtt tgt gtg	816
Ser Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg Val Cys Val	
260 265 270	

## 17

cag act gca tat ggt gtc gaa gtc gag gtg gaa aac aat cca tat gat	864
Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp	
275 280 285	
ccc agc tta atg gtt ttc atg gac tac aga gat tgc ttc aaa gac aaa	912
Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Phe Lys Asp Lys	
290 295 300	
ttc tca cat cct gag caa gga aat cca acg ttc ctc tat gcc atg ccc	960
Phe Ser His Pro Glu Gln Gly Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
305 310 315 320	
atg tca tcc aca cga att ttc ttt gag gaa aca tgc cta gct tct aaa	1008
Met Ser Ser Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys	
325 330 335	
gaa gca atg ccc ttt gac ctc ctt aaa aag cgg ttg atg tct cgg ttg	1056
Glu Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Arg Leu Met Ser Arg Leu	
340 345 350	
gat gca atg gga gtt cat att cga aaa gta tac gag gag gaa tgg tcc	1104
Asp Ala Met Gly Val His Ile Arg Lys Val Tyr Glu Glu Trp Ser	
355 360 365	
tac att cct gtt gga ggg tcc tta cca aat aca gac cag aaa aat ctc	1152
Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Asp Gln Lys Asn Leu	
370 375 380	
gca ttt ggt gcg gca gca agt atg gtg cat cct gca acc gga tac tcg	1200
Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser	
385 390 395 400	
gtg gtt aga tca ttg tct gaa gct cca aga tat gca tct gtg ata tct	1248
Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Arg Tyr Ala Ser Val Ile Ser	
405 410 415	
gat atc ttg aga aac cgt gtc tac cct gga gaa tat ttg cct gga acc	1296
Asp Ile Leu Arg Asn Arg Val Tyr Pro Gly Glu Tyr Leu Pro Gly Thr	
420 425 430	
tct caa agt tcc agt cca tca atg ctt gca tgg aga aca tta tgg ccc	1344
Ser Gln Ser Ser Ser Pro Ser Met Leu Ala Trp Arg Thr Leu Trp Pro	
435 440 445	
caa gaa cgg aaa cgt caa cga tca ttc ttc ctt ttt ggg ctg gct ttg	1392
Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu	
450 455 460	
ata atc caa ctg aat aac gaa ggc att cag aca ttc ttt gaa acc ttt	1440
Ile Ile Gln Leu Asn Asn Glu Gly Ile Gln Thr Phe Phe Glu Thr Phe	
465 470 475 480	
ttc cgg ttg ccc aaa tgg atg tgg cga gga ttc ctt ggt tcg acg ctt	1488
Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met Trp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Thr Leu	
485 490 495	
tct tca gtg gat ctc ata ctc ttt gca ttc tac atg ttc aca att gcg	1536
Ser Ser Val Asp Leu Ile Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Thr Ile Ala	
500 505 510	
ccg aac caa atg cga atg aac ctt gtc aga cat ctc ctc tct gat ccg	1584
Pro Asn Gln Met Arg Met Asn Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro	
515 520 525	
acc ggc tca acg atg atc aag acc tac ctg acc ttg taa	1623
Thr Gly Ser Thr Met Ile Lys Thr Tyr Leu Thr Leu	
530 535 540	

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 540

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;400&gt; 16

```

Met Glu Phe Ser Gly Gly Ala Thr Val Ser Ala Pro Phe Gly Cys Cys
  1           5           10           15
Arg Ala Ala Trp Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Glu Gly Arg
      20           25           30
Ser Arg Arg Val Val Pro Arg Ala Val Glu Pro Arg Arg Arg Gly Arg
      35           40           45
Trp Met Val Arg Cys Val Ala Thr Glu Lys His Lys Asp Ala Ala Ala
  50           55           60
Arg Arg Gly Gly Val Glu Val Glu Phe Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val
  65           70           75           80
Lys Gly Gly Gly Gly Glu Leu Leu Tyr Val Gln Met Gln Ala Ser Lys
      85           90           95
Ser Met Asp Ser Gln Ser Lys Ile Ser Ser Lys Leu Leu Pro Ile Pro
      100           105           110
Asp Glu Asn Ser Val Leu Asp Leu Val Ile Ile Gly Cys Gly Pro Ala
      115           120           125
Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Lys Gly Leu Asn Val Gly
      130           135           140
Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu
      145           150           155           160
Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Ser Cys Ile Glu His Val Trp
      165           170           175
Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Asn Lys Pro Ile Met Ile Gly
      180           185           190
Arg Ala Tyr Gly Arg Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu
      195           200           205
Arg Arg Cys Tyr Asp Ala Gly Val Thr Tyr Leu Ser Ser Lys Val Asp
      210           215           220
Lys Ile Met Glu Ser Pro Asp Gly His Arg Val Val Cys Cys Glu Gly
      225           230           235           240
Asp Arg Glu Val Leu Cys Arg Leu Ala Ile Val Ala Ser Gly Ala Ala
      245           250           255
Ser Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg Val Cys Val
      260           265           270
Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp
      275           280           285
Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Phe Lys Asp Lys
      290           295           300
Phe Ser His Pro Glu Gln Gly Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
      305           310           315           320
Met Ser Ser Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys
      325           330           335
Glu Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Arg Leu Met Ser Arg Leu
      340           345           350

```

Asp	Ala	Met	Gly	Val	His	Ile	Arg	Lys	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser
		355					360					365			
Tyr	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Asp	Gln	Lys	Asn	Leu
	370					375					380				
Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser
385					390					395					400
Val	Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Arg	Tyr	Ala	Ser	Val	Ile	Ser
				405					410					415	
Asp	Ile	Leu	Arg	Asn	Arg	Val	Tyr	Pro	Gly	Glu	Tyr	Leu	Pro	Gly	Thr
			420					425					430		
Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Met	Leu	Ala	Trp	Arg	Thr	Leu	Trp	Pro
		435					440					445			
Gln	Glu	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Ser	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu
	450					455					460				
Ile	Ile	Gln	Leu	Asn	Asn	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Phe	Phe	Glu	Thr	Phe
465					470					475					480
Phe	Arg	Leu	Pro	Lys	Trp	Met	Trp	Arg	Gly	Phe	Leu	Gly	Ser	Thr	Leu
				485					490					495	
Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Ile	Leu	Phe	Ala	Phe	Tyr	Met	Phe	Thr	Ile	Ala
			500					505					510		
Pro	Asn	Gln	Met	Arg	Met	Asn	Leu	Val	Arg	His	Leu	Leu	Ser	Asp	Pro
		515					520					525			
Thr	Gly	Ser	Thr	Met	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Thr	Leu				
	530					535					540				

<211> 8

<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> L/I variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> N/G/S variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> K/R variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (8)  
<223> V/L variation  
<400> 18  
Leu Asn Arg Xaa Tyr Gly Lys Val  
1 5  
<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Y/W variation  
<400> 19  
Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp  
1 5  
<210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> A/V variation  
<220>  
<221> VARIANT

21

&lt;222&gt; (8)

&lt;223&gt; P/A variation

&lt;400&gt; 20

Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro

1

5

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (7)

&lt;223&gt; S/A-variation

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (11)

&lt;223&gt; M/S variation

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (13)

&lt;223&gt; A/V variation

&lt;400&gt; 21

Ala Xaa Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala Arg

1

5

10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (7)

&lt;223&gt; R/K variation

&lt;400&gt; 22

Leu Trp Pro Xaa Glu Arg Arg Arg Gln Arg Xaa Phe Phe

1

5

10

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1780

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactuca sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (77)..(1675)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 23

gaaacaaatg acgtgaaagt tcttcaaaat tgaattaatt gtaatcctga aaacttgatt 60

## 22

tgtgatagaa gaatca atg gag tgc ttt gga gct cga aac atg acg gca aca 112  
 Met Glu Cys Phe Gly Ala Arg Asn Met Thr Ala Thr  
 1 5 10

atg gcg gtt ttt acg tgc cct aga ttc acg gac tgt aat atc agg cac 160  
 Met Ala Val Phe Thr Cys Pro Arg Phe Thr Asp Cys Asn Ile Arg His  
 15 20 25

aaa ttt tcg tta ctg aaa caa cga aga ttt act aat tta tca gca tcg 208  
 Lys Phe Ser Leu Leu Lys Gln Arg Arg Phe Thr Asn Leu Ser Ala Ser  
 30 35 40

tct tcg ttg cgt caa att aag tgc agc gct aaa agc gac cgt tgt gta 256  
 Ser Ser Leu Arg Gln Ile Lys Cys Ser Ala Lys Ser Asp Arg Cys Val  
 45 50 55 60

gtg gat aaa caa ggg att tcc gta gca gac gaa gaa gat tat gtg aag 304  
 Val Asp Lys Gln Gly Ile Ser Val Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val Lys  
 65 70 75

gcc ggt gga tcg gag ctg ttt ttt gtt caa atg cag cgg act aag tcc 352  
 Ala Gly Gly Ser Glu Leu Phe Phe Val Gln Met Gln Arg Thr Lys Ser  
 80 85 90

atg gaa agc cag tct aaa ctt tcc gaa aag cta gca cag ata cca att 400  
 Met Glu Ser Gln Ser Lys Leu Ser Glu Lys Leu Ala Gln Ile Pro Ile  
 95 100 105

gga aat tgc ata ctt gat ctg gtt gta atc ggt tgt ggc cct gct ggc 448  
 Gly Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly  
 110 115 120

ctt gct ctt gct gca gag tca gcc aaa cta ggg ttg aac gtt gga ctc 496  
 Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu  
 125 130 135 140

att ggc cct gat ctt cct ttt aca aac aat tat ggt gtt tgg cag gat 544  
 Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Gln Asp  
 145 150 155

gaa ttt ata ggt ctt gga ctt gaa gga tgc att gaa cat tct tgg aaa 592  
 Glu Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Ser Trp Lys  
 160 165 170

gat act ctt gta tac ctt gat gat gct gat ccc atc cgc ata ggt cgt 640  
 Asp Thr Leu Val Tyr Leu Asp Asp Ala Asp Pro Ile Arg Ile Gly Arg  
 175 180 185

gca tat ggc aga gtt cat cgt gat tta ctt cat gaa gag ttg tta aga 688  
 Ala Tyr Gly Arg Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg  
 190 195 200

agg tgt gtg gaa tca ggt gtt tca tat cta agc tcc aaa gta gaa aga 736  
 Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg  
 205 210 215 220

atc act gaa gct cca aat ggc tat agt ctc att gaa tgt gaa ggc aat 784  
 Ile Thr Glu Ala Pro Asn Gly Tyr Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn  
 225 230 235

atc acc att cca tgc agg ctt gct act gtt gca tca ggg gca gct tca 832  
 Ile Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser  
 240 245 250

ggg aaa ttt ctg gag tat gaa ctt ggg ggt ccc cgt gtt tgt gtc caa 880  
 Gly Lys Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln  
 255 260 265

## 23

aca gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa aac aac ccc tat gat cca	928
Thr Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro	
270 275 280	
gat cta atg gtg ttc atg gat tat aga gac ttc tca aaa cat aaa ccg	976
Asp Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Phe Ser Lys His Lys Pro	
285 290 295 300	
gaa tct tta gaa gca aaa tat ccg act ttc ctc tat gtc atg gcc atg	1024
Glu Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Ala Met	
305 310 315	
tct cca aca aaa ata ttc ttc gag gaa act tgt tta gct tca aga gaa	1072
Ser Pro Thr Lys Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Arg Glu	
320 325 330	
gcc atg cct ttc aat ctt cta aag tcc aaa ctc atg tca cga tta aag	1120
Ala Met Pro Phe Asn Leu Leu Lys Ser Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys	
335 340 345	
gca atg ggt atc cga ata aca aga acg tac gaa gag gaa tgg tcg tat	1168
Ala Met Gly Ile Arg Ile Thr Arg Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr	
350 355 360	
atc ccc gta ggt gga tcg tta cct aat aca gaa caa aag aat ctc gca	1216
Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala	
365 370 375 380	
ttt ggt gct gca gct agt atg gtg cac cct gcc aca ggg tat tca gtt	1264
Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val	
385 390 395	
gtt cga tct ttg tca gaa gct cct aat tat gca gca gtc att gct aag	1312
Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys	
400 405 410	
att tta aga caa gat caa tct aaa gag atg att tct ctt gga aaa tac	1360
Ile Leu Arg Gln Asp Gln Ser Lys Glu Met Ile Ser Leu Gly Lys Tyr	
415 420 425	
act aac att tca aaa caa gca tgg gaa aca ttg tgg cca ctt gaa agg	1408
Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg	
430 435 440	
aaa aga cag cga gcc ttc ttt cta ttc gga cta tca cac atc gtg cta	1456
Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser His Ile Val Leu	
445 450 455 460	
atg gat cta gag gga aca cgt aca ttt ttc cgt act ttc ttt cgt ttg	1504
Met Asp Leu Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu	
465 470 475	
ccc aaa tgg atg tgg tgg gga ttt ttg ggg tct tct tta tct tca acg	1552
Pro Lys Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr	
480 485 490	
gat ttg ata ata ttt gcg ctt tat atg ttt gtg ata gca cct cac agc	1600
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ala Pro His Ser	
495 500 505	
ttg aga atg gaa ctg gtt aga cat cta ctt tct gat ccg aca ggg gca	1648
Leu Arg Met Glu Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Ala	
510 515 520	
act atg gta aaa gca tat ctc act ata tagatttaga ttatataaat	1695
Thr Met Val Lys Ala Tyr Leu Thr Ile	
525 530	



24

aatacccata tcttgcata atataagcct tatttatttc ttttgtatcc ttacaacaac 1755  
 atactcgta attatatgtt tttta 1780

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 533

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactuca sativa

&lt;400&gt; 24

Met Glu Cys Phe Gly Ala Arg Asn Met Thr Ala Thr Met Ala Val Phe  
 1 5 10 15

Thr Cys Pro Arg Phe Thr Asp Cys Asn Ile Arg His Lys Phe Ser Leu  
 20 25 30

Leu Lys Gln Arg Arg Phe Thr Asn Leu Ser Ala Ser Ser Ser Leu Arg  
 35 40 45

Gln Ile Lys Cys Ser Ala Lys Ser Asp Arg Cys Val Val Asp Lys Gln  
 50 55 60

Gly Ile Ser Val Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser  
 65 70 75 80

Glu Leu Phe Phe Val Gln Met Gln Arg Thr Lys Ser Met Glu Ser Gln  
 85 90 95

Ser Lys Leu Ser Glu Lys Leu Ala Gln Ile Pro Ile Gly Asn Cys Ile  
 100 105 110

Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala  
 115 120 125

Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp  
 130 135 140

Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Gln Asp Glu Phe Ile Gly  
 145 150 155 160

Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Ser Trp Lys Asp Thr Leu Val  
 165 170 175

Tyr Leu Asp Asp Ala Asp Pro Ile Arg Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg  
 180 185 190

Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu  
 195 200 205

Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala  
 210 215 220

Pro Asn Gly Tyr Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro  
 225 230 235 240

Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu  
 245 250 255

Glu Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly  
 260 265 270

Ile Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Asp Leu Met Val  
 275 280 285

Phe Met Asp Tyr Arg Asp Phe Ser Lys His Lys Pro Glu Ser Leu Glu  
 290 295 300

Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Ala Met Ser Pro Thr Lys  
 305 310 315 320

## 25

Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Arg Glu Ala Met Pro Phe  
 325 330 335  
 Asn Leu Leu Lys Ser Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Ala Met Gly Ile  
 340 345 350  
 Arg Ile Thr Arg Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly  
 355 360 365  
 Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala  
 370 375 380  
 Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Arg Gln  
 405 410 415  
 Asp Gln Ser Lys Glu Met Ile Ser Leu Gly Lys Tyr Thr Asn Ile Ser  
 420 425 430  
 Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg  
 435 440 445  
 Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser His Ile Val Leu Met Asp Leu Glu  
 450 455 460  
 Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met  
 465 470 475 480  
 Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile  
 485 490 495  
 Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Glu  
 500 505 510  
 Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Val Lys  
 515 520 525  
 Ala Tyr Leu Thr Ile  
 530

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1848

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Adonis palaestina

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (116)..(1702)

&lt;223&gt; coding for epsilon cyclase

&lt;400&gt; 25

gagagaaaaa gagggtgtata ttaatgttac tgtcgcatc ttgcaacaca tattcagact 60  
 ccattttctt gttttctctt caaaacaaca aactaatgtg acggagtatc tagct atg 118  
 Met  
 1

gaa cta ctt ggt gtt cgc aac ctc atc tct tct tgc cct gtc tgg act 166  
 Glu Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp Thr  
 5 10 15

ttt gga aca aga aac ctt agt agt tca aaa cta gct tat aac ata cat 214  
 Phe Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile His  
 20 25 30

## 26

cga tat ggt tct tct tgt aga gta gat ttt caa gtg agg gct gat ggt	262
Arg Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp Gly	
35 40 45	
gga agc ggg agt aga act tct gtt gct tat aaa gag ggt ttt gtg gac	310
Gly Ser Gly Ser Arg Thr Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val Asp	
50 55 60 65	
gag gag gat ttt atc aaa gct ggt ggt tct gag ctt ttg ttt gtc caa	358
Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln	
70 75 80	
atg cag caa aca aag tct atg gag aaa cag gcc aag ctc gcc gat aag	406
Met Gln Gln Thr Lys Ser Met Glu Lys Gln Ala Lys Leu Ala Asp Lys	
85 90 95	
ttg cca cca ata cct ttc gga gaa tct gtg atg gac ttg gtt gta ata	454
Leu Pro Pro Ile Pro Phe Gly Glu Ser Val Met Asp Leu Val Val Ile	
100 105 110	
ggt tgt gga cct gct ggt ctt tca ctg gct gca gaa gct gct aag cta	502
Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys Leu	
115 120 125	
ggc ttg aaa gtt ggc ctt att ggt cct gat ctt cct ttt aca aat aat	550
Gly Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn	
130 135 140 145	
tat ggt gtg tgg gaa gac gag ttc aaa gat ctt gga ctt gaa cgt tgt	598
Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Arg Cys	
150 155 160	
atc gag cat gct tgg aag gac acc atc gta tat ctt gac aat gat gct	646
Ile Glu His Ala Trp Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asn Asp Ala	
165 170 175	
cct gtc ctt att ggt cgt gca tat gga cga gtt agc cgg cat ttg ctg	694
Pro Val Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu	
180 185 190	
cat gaa gag ttg ctg aaa agg tgt gtc gag tca ggt gta tca tat ctg	742
His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu	
195 200 205	
aat tct aaa gtg gaa agg atc act gaa gct ggt gat ggc cat agt ctt	790
Asn Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu	
210 215 220 225	
gta gtt tgt gaa aac gac atc ttt atc cct tgc agg ctt gct act gtt	838
Val Val Cys Glu Asn Asp Ile Phe Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val	
230 235 240	
gca tct gga gca gct tca ggg aaa ctt ttg gag tat gaa gta ggt ggc	886
Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly	
245 250 255	
cct cgt gtt tgt gtc caa act gct tat ggt gtg gag gtt gag gtg gag	934
Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu	
260 265 270	
aac aat cca tac gat ccc aac tta atg gta ttt atg gac tac aga gac	982
Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Asn Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp	
275 280 285	
tat atg caa cag aaa tta cag tgc tcg gaa gaa gaa tat cca aca ttt	1030
Tyr Met Gln Gln Lys Leu Gln Cys Ser Glu Glu Glu Tyr Pro Thr Phe	
290 295 300 305	

## 27

ctc tat gtc atg ccc atg tcg cca aca aga ctt ttt ttt gag gaa acc 1078  
Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Leu Phe Phe Glu Glu Thr  
310 315 320

tgt ttg gcc tca aaa gat gcc atg cct ttc gat cta ctg aag aga aaa 1126  
Cys Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Arg Lys  
325 330 335

cta atg tca cga ttg aag act ctg ggt atc caa gtt aca aaa att tat 1174  
Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Val Thr Lys Ile Tyr  
340 345 350

gaa gag gaa tgg tct tat att cct gtt ggg ggt tct tta cca aac aca 1222  
Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr  
355 360 365

gag caa aag aac cta gca ttt ggt gct gca gca agc atg gtg cat cca 1270  
Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro  
370 375 380 385

gca aca ggc tat tcg gtt gta cga tca cta tca gaa gct cca aaa tat 1318  
Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr  
390 395 400

gct tct gta att gca aag att ttg aag caa gat aac tct gca tat gtg 1366  
Ala Ser Val Ile Ala Lys Ile Leu Lys Gln Asp Asn Ser Ala Tyr Val  
405 410 415

gtt tct gga caa agc agt gca gta aac att tca atg caa gca tgg agc 1414  
Val Ser Gly Gln Ser Ser Ala Val Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp Ser  
420 425 430

agt ctt tgg cca aag gag cga aaa cgt caa aga gca ttc ttt ctt ttc 1462  
Ser Leu Trp Pro Lys Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe  
435 440 445

ggg tta gag ctt att gtg cag cta gat att gaa gca acc aga acg ttc 1510  
Gly Leu Glu Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu Ala Thr Arg Thr Phe  
450 455 460 465

ttt aga acc ttc ttc cgc ttg cca act tgg atg tgg tgg ggt ttc ctt 1558  
Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu  
470 475 480

ggg tct tca cta tca tct ttc gat ctt gta ttg ttt tcc atg tac atg 1606  
Gly Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr Met  
485 490 495

ttt gtt ttg gcc ccg aac agc atg agg atg tca ctt gtg aga cat ttg 1654  
Phe Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His Leu  
500 505 510

ctt tca gat cct tct ggt gca gtt atg gtt aaa gct tac ctc gaa agg 1702  
Leu Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Lys Ala Tyr Leu Glu Arg  
515 520 525

taatctgttt tatgaaacta tagtgtctca ttaaataaat gaggatcctt cgtatatgta 1762  
tatgatcatc tctatgtata tcctatatcc taatctcata aagtaatcga aaattcattg 1822  
atagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1848

<210> 26  
<211> 529  
<212> PRT  
<213> Adonis palaestina  
<400> 26  
Met Glu Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp  
1 5 10 15

Thr	Phe	Gly	Thr	Arg	Asn	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Tyr	Asn	Ile	
			20					25					30		
His	Arg	Tyr	Gly	Ser	Ser	Cys	Arg	Val	Asp	Phe	Gln	Val	Arg	Ala	Asp
		35					40					45			
Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Val	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gly	Phe	Val
	50					55					60				
Asp	Glu	Glu	Asp	Phe	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Leu	Phe	Val
65					70					75					80
Gln	Met	Gln	Gln	Thr	Lys	Ser	Met	Glu	Lys	Gln	Ala	Lys	Leu	Ala	Asp
				85					90					95	
Lys	Leu	Pro	Pro	Ile	Pro	Phe	Gly	Glu	Ser	Val	Met	Asp	Leu	Val	Val
		100					105						110		
Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys
		115					120					125			
Leu	Gly	Leu	Lys	Val	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Thr	Asn
	130					135					140				
Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	Glu	Arg
145					150				155						160
Cys	Ile	Glu	His	Ala	Trp	Lys	Asp	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Asn	Asp
				165				170						175	
Ala	Pro	Val	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	His	Leu
			180					185					190		
Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Arg	Cys	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr
		195					200					205			
Leu	Asn	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Ser
	210					215					220				
Leu	Val	Val	Cys	Glu	Asn	Asp	Ile	Phe	Ile	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr
225					230					235					240
Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Glu	Tyr	Glu	Val	Gly
				245					250					255	
Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Val
			260					265					270		
Glu	Asn	Asn	Pro	Tyr	Asp	Pro	Asn	Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg
		275					280					285			
Asp	Tyr	Met	Gln	Gln	Lys	Leu	Gln	Cys	Ser	Glu	Glu	Glu	Tyr	Pro	Thr
	290					295					300				
Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser	Pro	Thr	Arg	Leu	Phe	Phe	Glu	Glu
305					310					315					320
Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Arg
				325					330					335	
Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Gln	Val	Thr	Lys	Ile
			340					345					350		
Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn
		355					360					365			
Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala									

Tyr	Ala	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Ile	Leu	Lys	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Tyr
			405						410					415	
Val	Val	Ser	Gly	Gln	Ser	Ser	Ala	Val	Asn	Ile	Ser	Met	Gln	Ala	Trp
			420					425					430		
Ser	Ser	Leu	Trp	Pro	Lys	Glu	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Ala	Phe	Phe	Leu
		435					440					445			
Phe	Gly	Leu	Glu	Leu	Ile	Val	Gln	Leu	Asp	Ile	Glu	Ala	Thr	Arg	Thr
	450					455					460				
Phe	Phe	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Leu	Pro	Thr	Trp	Met	Trp	Trp	Gly	Phe
465					470					475					480
Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe	Asp	Leu	Val	Leu	Phe	Ser	Met	Tyr
			485					490						495	
Met	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	Asn	Ser	Met	Arg	Met	Ser	Leu	Val	Arg	His
			500					505					510		
Leu	Leu	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Met	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu	Glu
		515					520					525			

```
<210> 27
<211> 1898
<212> DNA
<213> Adonis palaestina

<220>
<221> CDS
<222> (113)..(1699)
<223> coding for epsilon-cyclase
```

<400> 27																60
aaaggagtgt tctattaatg ttactgtcgc attcttgcaa cacttatatt caaactccat																118
tttcttcttt tctcttcaaa acaacaaact aatgtgagca gagtatctgg ct atg gaa																1
																Met Glu
																1
cta	ctt	ggt	ggt	cgc	aac	ctc	atc	tct	tct	tgc	cct	gtg	tgg	act	ttt	166
Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Asn	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Pro	Val	Trp	Thr	Phe	
		5				10						15				
gga aca aga aac ctt agt agt tca aaa cta gct tat aac ata cat cga																214
Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile His Arg																
		20				25						30				
tat ggt tct tct tgt aga gta gat ttt caa gtg aga gct gat ggt gga																262
Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp Gly Gly																
		35				40				45				50		
agc ggg agt aga agt tct gtt gct tat aaa gag ggt ttt gtg gat gaa																310
Ser Gly Ser Arg Ser Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val Asp Glu																
				55						60				65		
gag gat ttt atc aaa gct ggt ggt tct gag ctt ttg ttt gtc caa atg																358
Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met																
				70				75				80				
cag caa aca aag tct atg gag aaa cag gcc aag ctc gcc gat aag ttg																406
Gln Gln Thr Lys Ser Met Glu Lys Gln Ala Lys Leu Ala Asp Lys Leu																
		85				90						95				

## 30

cca cca ata cct ttt gga gaa tcc gtg atg gac ttg gtt gta ata ggt	454
Pro Pro Ile Pro Phe Gly Glu Ser Val Met Asp Leu Val Val Ile Gly	
100 105 110	
tgt gga cct gct ggt ctt tca ctg gct gca gaa gct gct aag cta ggg	502
Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys Leu Gly	
115 120 125 130	
ttg aaa gtt ggc ctt att ggt cct gat ctt cct ttt aca aat aat tat	550
Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr	
135 140 145	
ggg gtg tgg gaa gac gag ttc aaa gat ctt gga ctt gaa cgt tgt atc	598
Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Arg Cys Ile	
150 155 160	
gag cat gct tgg aag gac acc atc gta tat ctt gat aat gat gct cct	646
Glu His Ala Trp Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asn Asp Ala Pro	
165 170 175	
gtc ctt att ggt cgt gca tat gga cga gtt agt cga cat ttg cta cat	694
Val Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His	
180 185 190	
gag gag ttg ctg aaa agg tgt gtg gag tca ggt gta tca tat ctg gat	742
Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Asp	
195 200 205 210	
tct aaa gtg gaa agg atc act gaa gct ggt gat ggc cat agc ctt gta	790
Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu Val	
215 220 225	
gtt tgt gaa aat gag atc ttt atc cct tgc agg ctt gct act gtt gca	838
Val Cys Glu Asn Glu Ile Phe Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala	
230 235 240	
tct gga gca gct tca ggg aaa ctt ttg gag tat gaa gta ggt ggc cct	886
Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro	
245 250 255	
cgt gtt tgt gtc caa acc gct tat ggg gtg gag gtt gag gtg gag aac	934
Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn	
260 265 270	
aat cca tac gat ccc aac tta atg gta ttc atg gac tac aga gac tat	982
Asn Pro Tyr Asp Pro Asn Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr	
275 280 285 290	
atg caa cag aaa tta cag tgc tcg gaa gaa gaa tat cca aca ttt ctc	1030
Met Gln Gln Lys Leu Gln Cys Ser Glu Glu Glu Tyr Pro Thr Phe Leu	
295 300 305	
tat gtc atg ccc atg tcg cca aca aga ctt ttt ttt gag gaa acc tgt	1078
Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Leu Phe Phe Glu Glu Thr Cys	
310 315 320	
ttg gcc tca aaa gat gcc atg cca ttc gat cta ctg aag aga aaa ctg	1126
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Arg Lys Leu	
325 330 335	
atg tca cga ttg aag act ctg ggt atc caa gtt aca aaa gtt tat gaa	1174
Met Ser Arg Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Val Thr Lys Val Tyr Glu	
340 345 350	
gag gaa tgg tca tat att cct gtt ggt ggt tct tta cca aac aca gag	1222
Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu	
355 360 365 370	

## 31

caa aag aac cta gca ttt ggt gct gca gca agc atg gtg cat cca gca 1270  
 Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala  
 375 380 385

aca ggc tat tcg gtt gta cgg tca ctg tca gaa gct cca aaa tat gct 1318  
 Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr Ala  
 390 395 400

tct gta att gca aag att ttg aag caa gat aac tct gcg tat gtg gtt 1366  
 Ser Val Ile Ala Lys Ile Leu Lys Gln Asp Asn Ser Ala Tyr Val Val  
 405 410 415

tct gga caa agt agt gca gta aac att tca atg caa gca tgg agc agt 1414  
 Ser Gly Gln Ser Ser Ala Val Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp Ser Ser  
 420 425 430

ctt tgg cca aag gag cga aaa cgt caa aga gca ttc ttt ctt ttt gga 1462  
 Leu Trp Pro Lys Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly  
 435 440 445 450

tta gag ctt att gtg cag cta gat att gaa gca acc aga aca ttc ttt 1510  
 Leu Glu Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu Ala Thr Arg Thr Phe Phe  
 455 460 465

aga acc ttc ttc cgc ttg cca act tgg atg tgg tgg ggt ttc ctt ggg 1558  
 Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly  
 470 475 480

tct tca cta tca tct ttc gat ctc gtc ttg ttt tcc atg tac atg ttt 1606  
 Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr Met Phe  
 485 490 495

gtt ttg gcg cca aac agc atg agg atg tca ctt gtg aga cat ttg ctt 1654  
 Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His Leu Leu  
 500 505 510

tca gat cct tct ggt gca gtt atg gta aga gct tac ctc gaa agg 1699  
 Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Arg Ala Tyr Leu Glu Arg  
 515 520 525

tagtctcatc tattattaaa ctctagtgtt tcaccaaata aatgaggatc cttcgaatgt 1759

gtatatgatc atctctatgt atatcctgta ctctaattctc ataaagtaaa tgccggggtt 1819

gatattgttg tgtcaaaccg gccaatgata taaagtaaat ttattgatac aaaagtagtt 1879

tttttcctta aaaaaaaaaa 1898

<210> 28

<211> 529

<212> PRT

<213> Adonis palaestina

<400> 28

Met Glu Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp  
 1 5 10 15

Thr Phe Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile  
 20 25 30

His Arg Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp  
 35 40 45

Gly Gly Ser Gly Ser Arg Ser Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val  
 50 55 60

Asp Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val  
 65 70 75 80



## 32

Gln Met Gln Gln Thr Lys Ser Met Glu Lys Gln Ala Lys Leu Ala Asp  
 85 90 95  
 Lys Leu Pro Pro Ile Pro Phe Gly Glu Ser Val Met Asp Leu Val Val  
 100 105 110  
 Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn  
 130 135 140  
 Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Glu His Ala Trp Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asn Asp  
 165 170 175  
 Ala Pro Val Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu  
 180 185 190  
 Leu His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr  
 195 200 205  
 Leu Asp Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gly His Ser  
 210 215 220  
 Leu Val Val Cys Glu Asn Glu Ile Phe Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val  
 260 265 270  
 Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Asn Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg  
 275 280 285  
 Asp Tyr Met Gln Gln Lys Leu Gln Cys Ser Glu Glu Glu Tyr Pro Thr  
 290 295 300  
 Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Leu Phe Phe Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Arg  
 325 330 335  
 Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Val Thr Lys Val  
 340 345 350  
 Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn  
 355 360 365  
 Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His  
 370 375 380  
 Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys  
 385 390 395 400  
 Tyr Ala Ser Val Ile Ala Lys Ile Leu Lys Gln Asp Asn Ser Ala Tyr  
 405 410 415  
 Val Val Ser Gly Gln Ser Ser Ala Val Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp  
 420 425 430  
 Ser Ser Leu Trp Pro Lys Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu  
 435 440 445  
 Phe Gly Leu Glu Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu Ala Thr Arg Thr  
 450 455 460

## 33

Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr  
 485 490 495  
 Met Phe Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His  
 500 505 510  
 Leu Leu Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Arg Ala Tyr Leu Glu  
 515 520 525  
 Arg

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1661

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(1501)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 29

g atg gat act ctg ttg aaa aca ccc aac aag ctc gat ttt ttc atc cct 49

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Lys Leu Asp Phe Phe Ile Pro

1

5

10

15

cag ttt cat ggg ttt gag aga tta tgc agt aac aat cca tac cct tca 97

Gln Phe His Gly Phe Glu Arg Leu Cys Ser Asn Asn Pro Tyr Pro Ser

20

25

30

agg gtt agg ctt ggt gtg aag aaa agg gct atc aaa att gtc tct agt 145

Arg Val Arg Leu Gly Val Lys Lys Arg Ala Ile Lys Ile Val Ser Ser

35

40

45

gta gtg agt ggt agc gct gct ctt ttg gat ctt gtt cct gaa act aag 193

Val Val Ser Gly Ser Ala Ala Leu Leu Asp Leu Val Pro Glu Thr Lys

50

55

60

aag gag aat ctt gac ttt gag ctt cct ttg tac gac act tcc aag agt 241

Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Leu Tyr Asp Thr Ser Lys Ser

65

70

75

80

caa gtt gtt gat ttg gct att gtt ggt ggt ggt cct gct ggt tta gcc 289

Gln Val Val Asp Leu Ala Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala

85

90

95

gtg gct cag cag gtt tct gaa gct gga ctc tct gtt tgt tcc att gat 337

Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp

100

105

110

cct tct cct aag ctc ata tgg cct aac aat tat gga gtt tgg gtt gat 385

Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp

115

120

125

gag ttt gag gct atg gat tta cta gac tgc ctg gat acc aca tgg tct 433

Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp Ser

130

135

140

ggt gct gtt gtc tat gtc gat gaa ggt gtc aag aag gat ttg agc cgg 481

Gly Ala Val Val Tyr Val Asp Glu Gly Val Lys Lys Asp Leu Ser Arg

145

150

155

160

34

cct tat ggg aga gtt aac cgg aaa cag ctc aaa tcc aaa atg ctt cag	529
Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Leu Gln	
165 170 175	
aaa tgt att acc aac ggt gtt aaa ttt cat cag tct aag gtc act aat	577
Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ser Lys Val Thr Asn	
180 185 190	
gtg gtt cac gag gag gca aac tcc act gtg gtc tgc agt gac ggt gta	625
Val Val His Glu Glu Ala Asn Ser Thr Val Val Cys Ser Asp Gly Val	
195 200 205	
aag att cag gct tcc gtg gtt ctt gat gcc act ggg ttt tcc cga tgc	673
Lys Ile Gln Ala Ser Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Cys	
210 215 220	
ttg gtt cag tat gac aaa cct tac aac cct ggg tac caa gta gct tac	721
Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr	
225 230 235 240	
ggg att ata gct gaa gtt gat ggt cac cca ttc gat gta gac aaa atg	769
Gly Ile Ile Ala Glu Val Asp Gly His Pro Phe Asp Val Asp Lys Met	
245 250 255	
gtg ttc atg gat tgg aga gac aaa cat ctg gac tca tat cct gag ctg	817
Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Lys His Leu Asp Ser Tyr Pro Glu Leu	
260 265 270	
aaa gaa cgg aac agc aag atc cca acg ttc ttg tac gct atg cca ttt	865
Lys Glu Arg Asn Ser Lys Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe	
275 280 285	
tct tcc aac cga ata ttt ctt gaa gaa act tct tta gtt gct aga cct	913
Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro	
290 295 300	
ggt ctg aga atg gaa gat atc caa gaa aga atg gct gct aga ctg aaa	961
Gly Leu Arg Met Glu Asp Ile Gln Glu Arg Met Ala Ala Arg Leu Lys	
305 310 315 320	
cat ctg ggg atc aat gtg aag agg att gag gaa gac gag cgt tgt gtg	1009
His Leu Gly Ile Asn Val Lys Arg Ile Glu Glu Asp Glu Arg Cys Val	
325 330 335	
atc ccg atg ggc ggt cct tta cca gtc tta cct caa cgg gtt gtg ggg	1057
Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly	
340 345 350	
att ggt ggg aca gca gga atg gtt cat cct tca act ggt tac atg gtt	1105
Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val	
355 360 365	
gct agg act ctt gca gct gca cca ata gtt gca aat gcc att gtg aga	1153
Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val Arg	
370 375 380	
tac ctc ggt tca cca agt agt aat agc ctg aga gga gat caa ctc tct	1201
Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Ser Asn Ser Leu Arg Gly Asp Gln Leu Ser	
385 390 395 400	
gct gag gtt tgg aga gac ttg tgg cct atc gaa cgg cgt aga cag agg	1249
Ala Glu Val Trp Arg Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg	
405 410 415	
gag ttc ttc tgt ttt gga atg gat att ctg ctg aaa ctc gat tta gac	1297
Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Asp	
420 425 430	

## 35

gct act aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gat ctg caa cct cat tac 1345  
Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Gln Pro His Tyr  
435 440 445

tgg cac gga ttc ttg tct tcc agg ctg ttt ctc ccg gaa ctg ttg gtc 1393  
Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val  
450 455 460

ttc ggg ttg tcg ctc ttc tca cac gct tcc aat acc tca aga ttg gag 1441  
Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu  
465 470 475 480

atc atg aca aag ggg act gtt cct ctt gct aag atg atc aac aat ttg 1489  
Ile Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Ala Lys Met Ile Asn Asn Leu  
485 490 495

gta caa gat aga gactaaggac cagaaactta gacatataag tatatctgtt 1541  
Val Gln Asp Arg  
500

ctttggttct tgaccagtag tatatccgca ttgcaagtcg ttggataatt gtgtataaac 1601  
cacagatcca taacctgaat ccttgtgaaa tcaaattggtt actactagtt cattaaaacc 1661

<210> 30  
<211> 500  
<212> PRT  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 30  
Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Lys Leu Asp Phe Phe Ile Pro  
1 5 10 15  
Gln Phe His Gly Phe Glu Arg Leu Cys Ser Asn Asn Pro Tyr Pro Ser  
20 25 30  
Arg Val Arg Leu Gly Val Lys Lys Arg Ala Ile Lys Ile Val Ser Ser  
35 40 45  
Val Val Ser Gly Ser Ala Ala Leu Leu Asp Leu Val Pro Glu Thr Lys  
50 55 60  
Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Leu Tyr Asp Thr Ser Lys Ser  
65 70 75 80  
Gln Val Val Asp Leu Ala Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala  
85 90 95  
Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp  
100 105 110  
Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp  
115 120 125  
Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp Ser  
130 135 140  
Gly Ala Val Val Tyr Val Asp Glu Gly Val Lys Lys Asp Leu Ser Arg  
145 150 155 160  
Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Leu Gln  
165 170 175  
Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ser Lys Val Thr Asn  
180 185 190  
Val Val His Glu Glu Ala Asn Ser Thr Val Val Cys Ser Asp Gly Val  
195 200 205

## 36

Lys Ile Gln Ala Ser Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Cys  
 210 215 220  
 Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Ile Ile Ala Glu Val Asp Gly His Pro Phe Asp Val Asp Lys Met  
 245 250 255  
 Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Lys His Leu Asp Ser Tyr Pro Glu Leu  
 260 265 270  
 Lys Glu Arg Asn Ser Lys Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe  
 275 280 285  
 Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro  
 290 295 300  
 Gly Leu Arg Met Glu Asp Ile Gln Glu Arg Met Ala Ala Arg Leu Lys  
 305 310 315 320  
 His Leu Gly Ile Asn Val Lys Arg Ile Glu Glu Asp Glu Arg Cys Val  
 325 330 335  
 Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val  
 355 360 365  
 Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val Arg  
 370 375 380  
 Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Ser Asn Ser Leu Arg Gly Asp Gln Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Ala Glu Val Trp Arg Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg  
 405 410 415  
 Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Asp  
 420 425 430  
 Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Gln Pro His Tyr  
 435 440 445  
 Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val  
 450 455 460  
 Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Ile Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Ala Lys Met Ile Asn Asn Leu  
 485 490 495  
 Val Gln Asp Arg  
 500

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 1550

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Citrus X paradisi

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (45)..(1355)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 31

aaataaaaaa cactggcaaa tgctctatta gtacagtgtt atta atg gac atg ttt 56

37

Met Asp Met Phe

1

ata cta ccg cca ata tca att ggt aat ggt att ttg gat ttg gtg gtg	104
Ile Leu Pro Pro Ile Ser Ile Gly Asn Gly Ile Leu Asp Leu Val Val	
5 10 15 20	
att ggt tgt ggc cca gct ggt ctt gct ttg gct gca gaa tca gcg aag	152
Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys	
25 30 35	
ttg gga tta aat gtt gga ctt att ggc ccg gat ctc cct ttc aca aac	200
Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn	
40 45 50	
aat tat ggt gtg tgg gaa gat gaa ttt aga gat ctt gga ctt gaa ggg	248
Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Arg Asp Leu Gly Leu Glu Gly	
55 60 65	
tgt atc gaa cat gtc tgg aga gac aca gtt gta tat att gat gaa gat	296
Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Ile Asp Glu Asp	
70 75 80	
gaa ccc atc ttg att ggt cgt gct tat gga cga gtt agt cga cat ttg	344
Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu	
85 90 95 100	
ctt cat gaa gaa tta tta aga agg tgt gtc gag tca ggt gtt tca tat	392
Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr	
105 110 115	
ctt agc tca aaa gtg gaa agc att acg gaa tct acc agt ggt cat cgt	440
Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser Ile Thr Glu Ser Thr Ser Gly His Arg	
120 125 130	
ctt gta gct tgt gaa cat gat atg att gtc ccc tgc agg ctt gct act	488
Leu Val Ala Cys Glu His Asp Met Ile Val Pro Cys Arg Leu Ala Thr	
135 140 145	
gtt gct tct gga gca gca tca ggg aag cta ttg gaa tat gag gtg ggg	536
Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly	
150 155 160	
ggt ccc aaa gtt tct gtc caa aca gct tat ggt gtg gag gtt gag gtg	584
Gly Pro Lys Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val	
165 170 175 180	
gaa aat aat cca tat gat cca agc ctt atg gtt ttc atg gac tac aga	632
Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg	
185 190 195	
gac tgt act aag caa gaa gtt cca tct ttt gaa tct gac aat cca aca	680
Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val Pro Ser Phe Glu Ser Asp Asn Pro Thr	
200 205 210	
ttt ctt tat gtc atg ccc atg tct tca aca aga gtt ttc ttt gag gaa	728
Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Ser Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu	
215 220 225	
act tgt ttg gca tcg aaa gat ggt tta cgt ttt gac ata ttg aag aaa	776
Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Gly Leu Arg Phe Asp Ile Leu Lys Lys	
230 235 240	
aag ctc atg gca agg tta gag aga ttg gga atc cag gtt ttg aaa act	824
Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu Arg Leu Gly Ile Gln Val Leu Lys Thr	
245 250 255 260	

38

tat gaa gag gaa tgg tca tat att cca gtt ggt ggt tcc tta cca aat 872  
Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn  
265 270 275

aca gaa caa aga aac ctc gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtg cat 920  
Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His  
280 285 290

cca gcc act ggc tac tca gta gtc aga tca ctg tca gag gct cca aac 968  
Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn  
295 300 305

tat gct tct gca att gca tat ata ttg aaa cac gat cat tcc aga ggt 1016  
Tyr Ala Ser Ala Ile Ala Tyr Ile Leu Lys His Asp His Ser Arg Gly  
310 315 320

aga ctt aca cat gaa caa agt aat gag aat atc tca atg caa gct tgg 1064  
Arg Leu Thr His Glu Gln Ser Asn Glu Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp  
325 330 335 340

aat act ctc tgg cca cag gaa agg aag cgc caa aga gct ttt ttc ctc 1112  
Asn Thr Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu  
345 350 355

ttt gga cta gca ctc att ttg caa ctg gat att gag ggc atc agg aca 1160  
Phe Gly Leu Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Thr  
360 365 370

ttc ttt cgc act ttc ttc cga tta ccc aag tgg atg tgg cac ggt ttc 1208  
Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met Trp His Gly Phe  
375 380 385

ctt ggt tct agt ctc tca tca gcc gat ctc att cta ttt gcc ttc tat 1256  
Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Ile Leu Phe Ala Phe Tyr  
390 395 400

atg ttt att ata gca cca aat gat ctg aga aag tgc ctt atc aga cat 1304  
Met Phe Ile Ile Ala Pro Asn Asp Leu Arg Lys Cys Leu Ile Arg His  
405 410 415 420

cta gtt tca gat cca act gga gca act atg gta aga aca tac ctg act 1352  
Leu Val Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Val Arg Thr Tyr Leu Thr  
425 430 435

tta tagttagttt gtattttcca tatttcagcc cttgttttgt atatttttga 1405  
Leu

ttgccatacg tgacacataa tgagcttgta tatatactcc atgtatactg taaactgtta 1465

gtttgacaaa tgaagccctt ttttattttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1525

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1550

<210> 32  
<211> 437  
<212> PRT  
<213> Citrus X paradisi

<400> 32  
Met Asp Met Phe Ile Leu Pro Pro Ile Ser Ile Gly Asn Gly Ile Leu  
1 5 10 15  
Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala  
20 25 30  
Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu  
35 40 45

## 39

Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Arg Asp Leu  
50 55 60

Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr  
65 70 75 80

Ile Asp Glu Asp Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val  
85 90 95

Ser Arg His Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser  
100 105 110

Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser Ile Thr Glu Ser Thr  
115 120 125

Ser Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu His Asp Met Ile Val Pro Cys  
130 135 140

Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu  
145 150 155 160

Tyr Glu Val Gly Gly Pro Lys Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val  
165 170 175

Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe  
180 185 190

Met Asp Tyr Arg Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val Pro Ser Phe Glu Ser  
195 200 205

Asp Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Ser Thr Arg Val  
210 215 220

Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Gly Leu Arg Phe Asp  
225 230 235 240

Ile Leu Lys Lys Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu Arg Leu Gly Ile Gln  
245 250 255

Val Leu Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly  
260 265 270

Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala  
275 280 285

Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser  
290 295 300

Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ser Ala Ile Ala Tyr Ile Leu Lys His Asp  
305 310 315 320

His Ser Arg Gly Arg Leu Thr His Glu Gln Ser Asn Glu Asn Ile Ser  
325 330 335

Met Gln Ala Trp Asn Thr Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg  
340 345 350

Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu  
355 360 365

Gly Ile Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met  
370 375 380

Trp His Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Ile Leu  
385 390 395 400

Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro Asn Asp Leu Arg Lys Cys  
405 410 415

Leu Ile Arg His Leu Val Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Val Arg  
420 425 430



Thr Tyr Leu Thr Leu  
435

<210> 33

<211> 1830

<212> DNA

<213> Citrus X paradisi

<220>

<221> CDS

<222> (89)..(1660)

<223> coding for epsilon-cyclase

<400> 33

```

gggttcagtt tgtcgttgag gacaggccac aaacgcaaca caagcttcat ctttaccaaa 60
tttccgtaag caacttctgg gctgaaaa atg ctc cca ttt ctc tcc tct ctg    112
                               Met Leu Pro Phe Leu Ser Ser Leu
                               1           5

ctt aat gga gtc acg gat aac cct tgt agg aaa gcc atg gat act tta    160
Leu Asn Gly Val Thr Asp Asn Pro Cys Arg Lys Ala Met Asp Thr Leu
      10           15           20

ctc aaa act cat aac aag ctt gaa ttc ttg ccc caa gtt cac ggg gct    208
Leu Lys Thr His Asn Lys Leu Glu Phe Leu Pro Gln Val His Gly Ala
      25           30           35           40

ttg gaa aaa tcc agt agt tta agc tca ttg aag att cag aac cag gag    256
Leu Glu Lys Ser Ser Ser Leu Ser Ser Leu Lys Ile Gln Asn Gln Glu
              45           50           55

ctt agg ttt ggt ctc aag aag tct cgt caa aag agg aat agg agt tgt    304
Leu Arg Phe Gly Leu Lys Lys Ser Arg Gln Lys Arg Asn Arg Ser Cys
              60           65           70

ttc att aag gct agt agt agt gct ctt ttg gag cta gtt cct gaa acc    352
Phe Ile Lys Ala Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
              75           80           85

aag aag gaa aat ctt gaa ttt gag ctt ccc atg tat gac cca tca aag    400
Lys Lys Glu Asn Leu Glu Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
      90           95           100

ggc ctt gtt gta gac cta gca gtt gtc ggt ggc ggc ccg gct ggg ctt    448
Gly Leu Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
     105           110           115           120

gct gtt gct cag caa gtt tca ggg gcg ggg ctt tcg gtt tgc tcg att    496
Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Gly Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
              125           130           135

gat cca tct ccc aaa ttg att tgg cca aat aat tat ggt gtt tgg gtg    544
Asp Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
              140           145           150

gat gaa ttt gag gcc atg gat ttg ctt gat tgc ctt gat act act tgg    592
Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp
              155           160           165

tct ggt gct gtt gtg cac att gat gat aat aca aag aag gat ctt aat    640
Ser Gly Ala Val Val His Ile Asp Asp Asn Thr Lys Lys Asp Leu Asn
      170           175           180

aga cct tat ggg aga gtt aat agg aag ttg ctg aag tcg aaa atg ctg    688
Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Leu Leu Lys Ser Lys Met Leu
     185           190           195           200

```

## 41

caa aaa tgc ata acc aat ggt gtt aag ttt cac caa gct aaa gtt att	736
Gln Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	
205 210 215	
aag gtt att cat gaa gag tcc aaa tct ttg ttg att tgc aat gat ggt	784
Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Leu Leu Ile Cys Asn Asp Gly	
220 225 230	
gtg aca att cag gca gcc gtg gtt ctt gat gct acg ggg ttc tct agg	832
Val Thr Ile Gln Ala Ala Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	
235 240 245	
tgt ctt gtc cag tat gat aag ccc tat aat cca ggt tac caa gtg gca	880
Cys Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	
250 255 260	
tat gga ata cta gct gag gta gaa cag cac ccg ttt gat tta gac aag	928
Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Gln His Pro Phe Asp Leu Asp Lys	
265 270 275 280	
atg gtt ttc atg gat tgg aga gat tcg cat ctg aac aac aat tcg cag	976
Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Asn Asn Asn Ser Gln	
285 290 295	
ctc aaa gag gca aat agc aaa att cct act ttt ctt tat gcc atg ccc	1024
Leu Lys Glu Ala Asn Ser Lys Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
300 305 310	
ttt tcg tca aac agg ata ttt ctt gaa gag act tcg cta gtg gcg cgg	1072
Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	
315 320 325	
cct gga gtg cca atg aaa gat atc cag gaa aga atg gtg gct aga tta	1120
Pro Gly Val Pro Met Lys Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	
330 335 340	
aag cac tta ggc ata aaa gtt aaa agc att gaa gag gat gag cat tgt	1168
Lys His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	
345 350 355 360	
gtc att ccg atg ggt ggg ccc ctt cca gtg ctt cct caa aga gtt gtt	1216
Val Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	
365 370 375	
gga ata ggt ggt acc gct ggg atg gtg cac cct tca act ggc tat atg	1264
Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	
380 385 390	
gtg gca agg act tta gct gcg gct cct att gtt gca aat gca atc gtt	1312
Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val	
395 400 405	
cga agc ctc agt tct gac aga agc att tca gga cac aaa ttg tct gct	1360
Arg Ser Leu Ser Ser Asp Arg Ser Ile Ser Gly His Lys Leu Ser Ala	
410 415 420	
gaa gtt tgg aaa gat ttg tgg ccc ata gaa agg aga agg caa agg gag	1408
Glu Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
425 430 435 440	
ttc ttc tgt ttt ggt atg gat atc ctg ctc aaa ctt gac tta cct gcc	1456
Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
445 450 455	
act agg agg ttt ttc gat gct ttt ttt gat ctg gag cct cgt tat tgg	1504
Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
460 465 470	

42

```

cat ggt ttc tta tca tcg aga ttg ttt ctc ccc gag ctt tta gtt ttt 1552
His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val Phe
      475                      480                      485

ggg ctt tct cta ttc tca cat gcc tct aat act tct agg cta gag atc 1600
Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu Ile
      490                      495                      500

atg gca aag gga act ctt cct ttg gtt aac atg atc aac aac ttg gta 1648
Met Ala Lys Gly Thr Leu Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Val
      505                      510                      515                      520

caa gat aca gat taaggtgacc atgatagtta taatgtgctt aataactcat 1700
Gln Asp Thr Asp

gcactaatcg tttataaaac acttcaaatt agttttgatg tttatagctt attacatgaa 1760
ccaaagctta tgatagacgt gctttgggtat ttaagagttt cagccaaaaa aaaaaaaaaa 1820
aaaaaaaaaa 1830

<210> 34
<211> 524
<212> PRT
<213> Citrus X paradisi

<400> 34
Met Leu Pro Phe Leu Ser Ser Leu Leu Asn Gly Val Thr Asp Asn Pro
  1                      5                      10                      15
Cys Arg Lys Ala Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr His Asn Lys Leu Glu
      20                      25                      30
Phe Leu Pro Gln Val His Gly Ala Leu Glu Lys Ser Ser Ser Leu Ser
      35                      40                      45
Ser Leu Lys Ile Gln Asn Gln Glu Leu Arg Phe Gly Leu Lys Lys Ser
      50                      55                      60
Arg Gln Lys Arg Asn Arg Ser Cys Phe Ile Lys Ala Ser Ser Ser Ala
      65                      70                      75                      80
Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr Lys Lys Glu Asn Leu Glu Phe Glu
      85                      90                      95
Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Leu Val Val Asp Leu Ala Val
      100                      105                      110
Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Gly
      115                      120                      125
Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp
      130                      135                      140
Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu
      145                      150                      155                      160
Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp Ser Gly Ala Val Val His Ile Asp
      165                      170                      175
Asp Asn Thr Lys Lys Asp Leu Asn Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg
      180                      185                      190
Lys Leu Leu Lys Ser Lys Met Leu Gln Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val
      195                      200                      205
Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys
      210                      215                      220
Ser Leu Leu Ile Cys Asn Asp Gly Val Thr Ile Gln Ala Ala Val Val
      225                      230                      235                      240

```

## 43

Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Cys Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro  
 245 250 255  
 Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu  
 260 265 270  
 Gln His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp  
 275 280 285  
 Ser His Leu Asn Asn Asn Ser Gln Leu Lys Glu Ala Asn Ser Lys Ile  
 290 295 300  
 Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro Gly Val Pro Met Lys Asp Ile  
 325 330 335  
 Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu Lys His Leu Gly Ile Lys Val Lys  
 340 345 350  
 Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Val Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu  
 355 360 365  
 Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met  
 370 375 380  
 Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val Arg Ser Leu Ser Ser Asp Arg Ser  
 405 410 415  
 Ile Ser Gly His Lys Leu Ser Ala Glu Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro  
 420 425 430  
 Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile  
 435 440 445  
 Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe  
 450 455 460  
 Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu  
 465 470 475 480  
 Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala  
 485 490 495  
 Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu Ile Met Ala Lys Gly Thr Leu Pro Leu  
 500 505 510  
 Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Val Gln Asp Thr Asp  
 515 520

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 787

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Citrus sinensis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(787)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 35

t ctt gct ttg gct gca gaa tca gcg aag ttg gga tta aat gtt gga ctt 49  
 Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu  
 1 5 10 15

## 44

att ggc ccg gat ctc cct ttc aca aac aat tat ggt gtg tgg gaa gat 97  
 Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp  
 20 25 30

gaa ttt aga gat ctt gga ctt gaa ggg tgt atc gaa caa gtc tgg aga 145  
 Glu Phe Arg Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu Gln Val Trp Arg  
 35 40 45

gac aca gtt gta tat att gat gaa gat gaa ccc atc ttg att ggt cgt 193  
 Asp Thr Val Val Tyr Ile Asp Glu Asp Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg  
 50 55 60

gct tat gga cga gtt agt cga cat ttg ctt cat gaa gaa tta tta aga 241  
 Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg  
 65 70 75 80

agg tgt gtc gag tca ggt gta tca tat ctt agc tca aaa gtg gaa agc 289  
 Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser  
 85 90 95

att acg gaa tct acc agt ggt cat cgt ctt gta gct tgt gaa cat gat 337  
 Ile Thr Glu Ser Thr Ser Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu His Asp  
 100 105 110

atg att gtc ccc tgc agg ctt gct act gtt gct tct gga gca gca tca 385  
 Met Ile Val Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser  
 115 120 125

ggg aag cta ttg gaa tat ggg gtg ggg ggt ccc aaa gtt tct gtc caa 433  
 Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Gly Val Gly Gly Pro Lys Val Ser Val Gln  
 130 135 140

aca gct tat ggt gtg gag gtt gag gtg gaa aat aat cca tat gat cca 481  
 Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro  
 145 150 155 160

agc ctt atg gtt ttc atg gac tac aga gac tgt act aag caa gaa gtt 529  
 Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val  
 165 170 175

cca tct ttt gaa tct gac aat cca aca ttt ctt tat gtc atg ccc atg 577  
 Pro Ser Phe Glu Ser Asp Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met  
 180 185 190

tct tca aca aga gtt ttc ttt gag gaa act tgt ttg gca tcg aaa gat 625  
 Ser Ser Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp  
 195 200 205

ggc tta cgt ttt gac ata ttg aag aaa aag ctc atg gca agg tta gag 673  
 Gly Leu Arg Phe Asp Ile Leu Lys Lys Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu  
 210 215 220

aga ttg gga atc cag gtt ttg aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat 721  
 Arg Leu Gly Ile Gln Val Leu Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr  
 225 230 235 240

att cca gtt ggt ggt tcc tta cca aat aca gaa caa aga aac ctc gca 769  
 Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala  
 245 250 255

tat ggt gct gct gct gct agc 787  
 Tyr Gly Ala Ala Ala Ser  
 260

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 262

45

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Citrus sinensis

&lt;400&gt; 36

Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu  
1 5 10 15  
Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp  
20 25 30  
Glu Phe Arg Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu Gln Val Trp Arg  
35 40 45  
Asp Thr Val Val Tyr Ile Asp Glu Asp Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg  
50 55 60  
Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg  
65 70 75 80  
Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser  
85 90 95  
Ile Thr Glu Ser Thr Ser Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu His Asp  
100 105 110  
Met Ile Val Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser  
115 120 125  
Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Gly Val Gly Gly Pro Lys Val Ser Val Gln  
130 135 140  
Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro  
145 150 155 160  
Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val  
165 170 175  
Pro Ser Phe Glu Ser Asp Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met  
180 185 190  
Ser Ser Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp  
195 200 205  
Gly Leu Arg Phe Asp Ile Leu Lys Lys Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu  
210 215 220  
Arg Leu Gly Ile Gln Val Leu Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr  
225 230 235 240  
Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala  
245 250 255  
Tyr Gly Ala Ala Ala Ser  
260

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 2357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Spinacia oleracea

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (264)..(1814)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase

&lt;400&gt; 37

gcacgagaca ccacaaaacc attgaggaga gagaaagtca accaaatttc acaccttcca 60

cctccctcttt	ccatggccgc	aacccaaacc	cagccacctt	caccgcccgc	gtcgacagca	120
cactgaactt	caccactaca	aacttaaaaa	aaatcttggga	gaaattttgat	tccgtaaaaa	180
tggagtatta	ttgtctcgga	gcttcgaaat	tcgcaacaat	ggcggtttct	cctgcgctta	240
atcacgacaa	tttgaggaat	aaa atg gtt	aaa caa cgc	cag aat ttc	cag acg	293
		Met Val Lys	Gln Arg	Gln Asn	Phe Gln Thr	
		1		5		10
ttt tgc ttt tgg	agg ccg aat tct	tcg aac gtt	gta gta gaa	tgt agt		341
Phe Cys Phe Trp	Arg Pro Asn Ser	Ser Ser Asn Val	Val Val Val	Glu Cys Ser		
	15		20	25		
agt cgt agg agt	gga agt agt gtt	ttg agg agt	gcg aat agc	gac agt		389
Ser Arg Arg Ser	Gly Ser Ser Val	Leu Arg Ser	Ala Asn Ser	Asp Ser		
	30	35	40			
agt tgc gta att	gcg cca gag gat	ttt gcg aac	gaa gaa gat	ttc atc		437
Ser Cys Val Ile	Ala Pro Glu Asp	Phe Ala Asn	Glu Glu Asp	Phe Ile		
	45	50	55			
aaa gct ggt ggt	tcc gag ctt ctt	tat gtt caa atg	cag cag aat	aaa		485
Lys Ala Gly Gly	Ser Glu Leu Leu	Tyr Val Gln Met	Gln Gln Asn	Lys		
	60	65	70			
gct atg gat tgt	tac tcc aaa att	tcc gat aag ctg	cgt caa ata	tca		533
Ala Met Asp Cys	Tyr Ser Lys Ile	Ser Asp Lys Leu	Arg Gln Ile	Ser		
	75	80	85	90		
gat gcc aat gaa	ctg ctg gat atg	gtg gtt att ggt	tgt ggt cca	gct		581
Asp Ala Asn Glu	Leu Leu Asp Met	Val Val Ile Gly	Cys Gly Pro	Ala		
	95	100	105			
ggt cta gct ttg	gct gca gaa tcg	gct aaa ctt	gga tta aaa	ggt ggc		629
Gly Leu Ala Leu	Ala Ala Glu Ser	Ala Lys Leu Gly	Leu Lys Val	Gly		
	110	115	120			
ctt gtt ggt cct	gat ctt cct ttt	acg aat aac tac	ggc gtt tgg	gaa		677
Leu Val Gly Pro	Asp Leu Pro Phe	Thr Asn Asn Tyr	Gly Val Trp	Glu		
	125	130	135			
gat gaa ttc aga	gca ttg gga ctt	gga ggc tgt atc	gag cac gtt	tgg		725
Asp Glu Phe Arg	Ala Leu Gly Leu	Gly Gly Cys Ile	Glu His Val	Trp		
	140	145	150			
cgt gat acc att	gtg tat att gat	gat gac aat cct	ata tat att	ggt		773
Arg Asp Thr Ile	Val Tyr Ile Asp	Asp Asp Asn Pro	Ile Tyr Ile	Gly		
	155	160	165	170		
cga tct tat gga	aaa gtc agc cgg	caa tta ctt cac	aag gaa ctg	gtg		821
Arg Ser Tyr Gly	Lys Val Ser Arg	Gln Leu Leu His	Lys Glu Leu	Val		
	175	180	185			
cac agg tgt ttg	gag tca ggt gtc	tct tat ctg aat	gcg aaa gtg	gaa		869
His Arg Cys Leu	Glu Ser Gly Val	Ser Tyr Leu Asn	Ala Lys Val	Glu		
	190	195	200			
aat att atg gaa	gga cct gat gga	cat agg ctt gtt	gct tgt gaa	cgt		917
Asn Ile Met Glu	Gly Pro Asp Gly	His Arg Leu Val	Ala Cys Glu	Arg		
	205	210	215			
ggt gtc act att	ccc tgc agg ctt	gta act gtt gca	tct gga gca	gct		965
Gly Val Thr Ile	Pro Cys Arg Leu	Val Thr Val Ala	Ser Gly Ala	Ala		
	220	225	230			
tca ggg aaa ctt	ctg gag tat gaa	gtg ggt ggt cca	agg gtt tgt	gta		1013
Ser Gly Lys Leu	Leu Glu Tyr Glu	Val Gly Gly Pro	Arg Val Cys	Val		
	235	240	245	250		

## 47

caa aca gct tat ggt gtg gag gtg gag gtg gaa aac agt cct tat gat	1061
Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Ser Pro Tyr Asp	
255 260 265	
ccc aat gtg atg gtg ttc atg gac tac aga gac tac act aaa ctg agc	1109
Pro Asn Val Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys Leu Ser	
270 275 280	
gtt caa tct ctg gag gca aag tat cca aca ttc ttg tat gca atg ccg	1157
Val Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
285 290 295	
ata tca cca act agg atc ttc ttt gag gag act tgc ttg gct tca gta	1205
Ile Ser Pro Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Val	
300 305 310	
gat gca atg ccc ttt gac ctg ctc aag aaa aag ctt atg aca aga tta	1253
Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met Thr Arg Leu	
315 320 325 330	
caa act atg ggt gtt cgt atc acc aaa ata tat gaa gag gag tgg tct	1301
Gln Thr Met Gly Val Arg Ile Thr Lys Ile Tyr Glu Glu Glu Trp Ser	
335 340 345	
tat ata cct gtt ggt ggg tcc tta cca aat aca gag caa aga aac ctt	1349
Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu	
350 355 360	
gca ttt ggt gct gct gcg agc atg gtg cat cca gcc aca ggt tat tca	1397
Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser	
365 370 375	
gtc gtg aga tca ctg tca gaa gct cca aag tat gct tct gca att gca	1445
Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr Ala Ser Ala Ile Ala	
380 385 390	
aac ttg atc aag aat gac ctg tca aaa aat gca ata ttg cgt cag agg	1493
Asn Leu Ile Lys Asn Asp Leu Ser Lys Asn Ala Ile Leu Arg Gln Arg	
395 400 405 410	
agt gtg ggg aat atc tca atg caa gcc tgg aat act ctt tgg cca caa	1541
Ser Val Gly Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp Asn Thr Leu Trp Pro Gln	
415 420 425	
gaa agg aaa cgt cag aga gca ttc ttc ctg ttc gga cta tca ctt ata	1589
Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser Leu Ile	
430 435 440	
gtc cag ctt gat att gag ggt atc agg aca ttc ttc cgc acc ttc ttc	1637
Val Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe	
445 450 455	
cga gtg cca aaa tgg atg tgg gag gga ttc ctc ggt tct aat ctc tct	1685
Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Glu Gly Phe Leu Gly Ser Asn Leu Ser	
460 465 470	
tca gct gat ctc ata ttg ttt gcc ttt tat atg ttc ttt att gct ccg	1733
Ser Ala Asp Leu Ile Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Phe Ile Ala Pro	
475 480 485 490	
aat gac ttg aga atg ggt ctt ata agg cat cta cta tct gat cct aca	1781
Asn Asp Leu Arg Met Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr	
495 500 505	
ggg gcg acc atg ata aga acg tac ata aca cta taaaagtaat atgaaatgct	1834
Gly Ala Thr Met Ile Arg Thr Tyr Ile Thr Leu	
510 515	



48

cactcctttg tacatcatgc aaaattggta cgaattgact ggactatgca gtctaacttg 1894  
 gtgtaaaaaa aacacaatta ataaattttt tgtaggtgca gcctctatac ttgatattct 1954  
 cgattcagat ataattttgt cagtattctt cgtaaagat cagttgtttc tacaattcca 2014  
 gaggcctctg gaattggtgt tacccttcca tgtagctcat tgataaatgt tgagggtaga 2074  
 ggctttttct tagatgcttg cttgcagctt gctcatggat atattcagtt gttcagtaga 2134  
 cacgttaaca actactacag tggggggcatc attgatctgg accggggagag ctgagcatct 2194  
 atcacaggtt agccagctca actacgtagg tcaaccttga gccactccca aacatttttg 2254  
 cagctgatgg ggttcaccct gtaaggtgag tttcttacca actccaccaa cttatgttgg 2314  
 ttttaaattg ctactcgtct gttatgaagt agcaagctcg tgc 2357

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 517

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Spinacia oleracea

&lt;400&gt; 38

Met Val Lys Gln Arg Gln Asn Phe Gln Thr Phe Cys Phe Trp Arg Pro  
 1 5 10 15

Asn Ser Ser Asn Val Val Val Glu Cys Ser Ser Arg Arg Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ser Val Leu Arg Ser Ala Asn Ser Asp Ser Ser Cys Val Ile Ala Pro  
 35 40 45

Glu Asp Phe Ala Asn Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu  
 50 55 60

Leu Leu Tyr Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ala Met Asp Cys Tyr Ser  
 65 70 75 80

Lys Ile Ser Asp Lys Leu Arg Gln Ile Ser Asp Ala Asn Glu Leu Leu  
 85 90 95

Asp Met Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala  
 100 105 110

Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Lys Val Gly Leu Val Gly Pro Asp Leu  
 115 120 125

Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Arg Ala Leu  
 130 135 140

Gly Leu Gly Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr  
 145 150 155 160

Ile Asp Asp Asp Asn Pro Ile Tyr Ile Gly Arg Ser Tyr Gly Lys Val  
 165 170 175

Ser Arg Gln Leu Leu His Lys Glu Leu Val His Arg Cys Leu Glu Ser  
 180 185 190

Gly Val Ser Tyr Leu Asn Ala Lys Val Glu Asn Ile Met Glu Gly Pro  
 195 200 205

Asp Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu Arg Gly Val Thr Ile Pro Cys  
 210 215 220

Arg Leu Val Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu  
 225 230 235 240

Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val  
 245 250 255

49

Glu Val Glu Val Glu Asn Ser Pro Tyr Asp Pro Asn Val Met Val Phe  
 260 265 270  
 Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys Leu Ser Val Gln Ser Leu Glu Ala  
 275 280 285  
 Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Ile Ser Pro Thr Arg Ile  
 290 295 300  
 Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Val Asp Ala Met Pro Phe Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met Thr Arg Leu Gln Thr Met Gly Val Arg  
 325 330 335  
 Ile Thr Lys Ile Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly  
 340 345 350  
 Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala  
 355 360 365  
 Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser  
 370 375 380  
 Glu Ala Pro Lys Tyr Ala Ser Ala Ile Ala Asn Leu Ile Lys Asn Asp  
 385 390 395 400  
 Leu Ser Lys Asn Ala Ile Leu Arg Gln Arg Ser Val Gly Asn Ile Ser  
 405 410 415  
 Met Gln Ala Trp Asn Thr Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg  
 420 425 430  
 Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu  
 435 440 445  
 Gly Ile Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met  
 450 455 460  
 Trp Glu Gly Phe Leu Gly Ser Asn Leu Ser Ser Ala Asp Leu Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Phe Ala Phe Tyr Met Phe Phe Ile Ala Pro Asn Asp Leu Arg Met Gly  
 485 490 495  
 Leu Ile Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Ile Arg  
 500 505 510  
 Thr Tyr Ile Thr Leu  
 515

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 1378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(1147)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 39

t agc ggn nnn nag gat gag ttc aaa gat ctt ggt ctt caa gcc tgc att 49  
 Ser Xaa Xaa Xaa Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys Ile  
 1 5 10 15

gaa cat gtt tgg cgg gat acc att gta tat ctt gat gat gat cct 97  
 Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Asp Pro  
 20 25 30

50

att ctt att ggc cgt gcc tat gga aga gtt agt cgc cat tta ctg cac	145
Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His	
35 40 45	
gag gag tta ctc aaa agg tgt gtg gag gca ggt gtt ttg tat cta aac	193
Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu Asn	
50 55 60	
tcg aaa gtg gat agg att gtt gag gcc aca aat ggc cac agt ctt gta	241
Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly His Ser Leu Val	
65 70 75 80	
gag tgc gag ggt gat gtt gtg att ccc tgc agg ttt gtg act gtt gca	289
Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val Ala	
85 90 95	
tcg gga gca gcc tcg ggg aaa ttc ttg cag tat gag ttg gga ggt cct	337
Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro	
100 105 110	
aga gtt tct gtt caa aca gct tat gga gtg gaa gtt gag gtc gat aac	385
Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp Asn	
115 120 125	
aat cca ttt gac ccg agc ctg atg gtt ttc atg gat tat aga gac tat	433
Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr	
130 135 140	
gtc aga cac gac gct caa tct tta gaa gct aaa tat cca aca ttt ctc	481
Val Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu	
145 150 155 160	
tat gcc atg ccc atg tct cca aca cga gtc ttt ttc gag gaa act tgt	529
Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys	
165 170 175	
ttg gct tca aaa gat gca atg cca ttc gat ctg tta aag aaa aaa ttg	577
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu	
180 185 190	
atg tta cga ttg aac acc ctc ggt gta aga att aaa gaa att tat gag	625
Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr Glu	
195 200 205	
gag gaa tgg tct tac ata cca gtt gga gga tct ttg cca aat aca gaa	673
Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu	
210 215 220	
caa aaa aca ctt gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtt cat cca gcc	721
Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala	
225 230 235 240	
aca ggt tat tca gtc gtc aga tca ctg tct gaa gct cca aaa tgc gcc	769
Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys Ala	
245 250 255	
ttc gtg ctt gca aat ata tta cga caa aat cat agc aag aat atg ctt	817
Phe Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln Asn His Ser Lys Asn Met Leu	
260 265 270	
act agt tca agt acc ccg agt att tca act caa gct tgg aac act ctt	865
Thr Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr Leu	
275 280 285	
tgg cca caa gaa cga aaa cga caa aga tcg ttt ttc cta ttt gga ctg	913
Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu	
290 295 300	

## 51

gct ctg ata ttg cag ctg gat att gag ggg ata agg tca ttt ttc cgc 961  
 Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg  
 305 310 315 320  
 gcg ttc ttc cgt gtg cca aaa tgg atg tgg cag gga ttt ctt ggt tca 1009  
 Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser  
 325 330 335  
 agt ctt tct tna gca gac ctc atg tta ttt gcc ttc tac atg ttt att 1057  
 Ser Leu Ser Xaa Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile  
 340 345 350  
 att gca cca aat gac atg aga aga ggc tta atc aga cat ctt tta tct 1105  
 Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Arg Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser  
 355 360 365  
 gat cct act ggt gca aca ttg ata aga act tat ctt aca ttt 1147  
 Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
 370 375 380  
 tagagtaaatt tcctcctacà atagttgttg aannagaggc ctcattactt cagattcata 1207  
 acagaaatcg cggctctctcg aggccttgta tataacattt tcactagggtt aatattgctt 1267  
 gaataagttg cacagtttca gtttttgtat ctgcttcttt tttgtccaag atcatgtatt 1327  
 ganccaattt atatacattg ccagtatata taaattttat aaaaaaaaaa a 1378  
 <210> 40  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> Solanum tuberosum  
 <400> 40  
 Ser Xaa Xaa Xaa Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys Ile  
 1 5 10 15  
 Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Asp Pro  
 20 25 30  
 Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His  
 35 40 45  
 Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu Asn  
 50 55 60  
 Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly His Ser Leu Val  
 65 70 75 80  
 Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val Ala  
 85 90 95  
 Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro  
 100 105 110  
 Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp Asn  
 115 120 125  
 Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr  
 130 135 140  
 Val Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys  
 165 170 175  
 Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu  
 180 185 190

## 52

Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr Glu  
 195 200 205

Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu  
 210 215 220

Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala  
 225 230 235 240

Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys Ala  
 245 250 255

Phe Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln Asn His Ser Lys Asn Met Leu  
 260 265 270

Thr Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr Leu  
 275 280 285

Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu  
 290 295 300

Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg  
 305 310 315 320

Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser  
 325 330 335

Ser Leu Ser Xaa Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile  
 340 345 350

Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Arg Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser  
 355 360 365

Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
 370 375 380

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 497

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Daucus carota

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(495)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 41

tat ggt gtt tgg gtg gat gaa ttt ata gat ctt gga ctt gaa ggg tgt 48  
 Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu Phe Ile Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys  
 1 5 10 15

att gag cat gtt tgg cgg gat act att gta tat ctt gat gat ggt gat 96  
 Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Gly Asp  
 20 25 30

cct att atg att ggc cgt gct tac gga aga gtt agt cgc cat ttg ctt 144  
 Pro Ile Met Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu  
 35 40 45

cat gaa gaa ttg ctt aaa agg tgt gtc gag tca ggt gtt tcg tat ctt 192  
 His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu  
 50 55 60

agc tca aaa gtt gaa aag att att gaa gct gga gat ggc cac agc ctg 240  
 Ser Ser Lys Val Glu Lys Ile Ile Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu  
 65 70 75 80

## 53

gtt gag tgt gaa aat aat att gtc att cca tgc agg ctt gct act gtt 288  
Val Glu Cys Glu Asn Asn Ile Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val  
85 90 95

gca tct gga gca gct tct ggg aaa ctt ttg cag tat gag gtt ggg ggt 336  
Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val Gly Gly  
100 105 110

ccc aga gtt tct gtc caa aca gct tat ggt gtc gag gtt gag gtg gaa 384  
Pro Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu  
115 120 125

aac aat cca tat gat ccc agt cta atg gtt ttc atg gat tac aga gat 432  
Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp  
130 135 140

tat acc aaa caa aaa gtt cca ggc atg gag gca gaa tat cca act ttc 480  
Tyr Thr Lys Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe  
145 150 155 160

ctg tat gcc atg cca tt 497  
Leu Tyr Ala Met Pro  
165

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 165

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Daucus carota

&lt;400&gt; 42

Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu Phe Ile Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys  
1 5 10 15

Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Gly Asp  
20 25 30

Pro Ile Met Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu  
35 40 45

His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu  
50 55 60

Ser Ser Lys Val Glu Lys Ile Ile Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu  
65 70 75 80

Val Glu Cys Glu Asn Asn Ile Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val  
85 90 95

Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val Gly Gly  
100 105 110

Pro Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu  
115 120 125

Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp  
130 135 140

Tyr Thr Lys Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe  
145 150 155 160

Leu Tyr Ala Met Pro  
165

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 605

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Daucus carota

54

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(605)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 43

```

tc att ggc cgt gct tat gga aga tta gtc gcc att tgc ttc atg aag      47
  Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Leu Val Ala Ile Cys Phe Met Lys
    1             5             10             15

aat tgc tta aaa ggt gtg tcg agt cag gtg ttt cgt atc tta gct caa      95
Asn Cys Leu Lys Gly Val Ser Ser Gln Val Phe Arg Ile Leu Ala Gln
          20             25             30

aag ttg aaa aga tta ttg aag ctg gag atg gcc aca gcc tgg ttg agt     143
Lys Leu Lys Arg Leu Leu Lys Leu Glu Met Ala Thr Ala Trp Leu Ser
          35             40             45

gtg aaa ata ata ttg tca ttc cat gca ggc ttg cta ctg ttg cat ctg     191
Val Lys Ile Ile Leu Ser Phe His Ala Gly Leu Leu Leu Leu His Leu
          50             55             60

gag cag ctt ctg gga aac ttt tgc agt atg ggg ttg ggg gtc cca gag     239
Glu Gln Leu Leu Gly Asn Phe Cys Ser Met Gly Leu Gly Val Pro Glu
          65             70             75

ttt ctg tcc aaa cag ctt atg gtg tcg agg ttg agg tgg aaa cca atc     287
Phe Leu Ser Lys Gln Leu Met Val Ser Arg Leu Arg Trp Lys Pro Ile
          80             85             90             95

cca tat gat ccc agt cta atg gtt ttc atg gat tac aga gat tat acc     335
Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr
          100             105             110

aaa caa aaa gtt cca ggc atg gag gca gaa tat cca aca ttt ctt tat     383
Lys Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr
          115             120             125

gtg atg ccc atg tcc cca aca agg att ttc ttt gag gag aca tgt ttg     431
Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu
          130             135             140

gct tca aaa gat gcg atg cca ttc gat cta ctg aag aaa aaa ctc atg     479
Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met
          145             150             155

tca aga tta cag acg atg gga att cga gtt gcc aag aca tat gaa gag     527
Ser Arg Leu Gln Thr Met Gly Ile Arg Val Ala Lys Thr Tyr Glu Glu
          160             165             170             175

gaa tgg tct tat ata cct gtt ggg gga tct tta cct aat act gag caa     575
Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln
          180             185             190

aag aat ctc gcc ttt ggt gct gcc gct aga                             605
Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Arg
          195             200

```

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 201

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Daucus carota

&lt;400&gt; 44

```

Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Leu Val Ala Ile Cys Phe Met Lys Asn
  1             5             10             15

```

55

Cys Leu Lys Gly Val Ser Ser Gln Val Phe Arg Ile Leu Ala Gln Lys  
                   20                  25                  30  
 Leu Lys Arg Leu Leu Lys Leu Glu Met Ala Thr Ala Trp Leu Ser Val  
           35                  40                  45  
 Lys Ile Ile Leu Ser Phe His Ala Gly Leu Leu Leu Leu His Leu Glu  
           50                  55                  60  
 Gln Leu Leu Gly Asn Phe Cys Ser Met Gly Leu Gly Val Pro Glu Phe  
           65                  70                  75                  80  
 Leu Ser Lys Gln Leu Met Val Ser Arg Leu Arg Trp Lys Pro Ile Pro  
                   85                  90                  95  
 Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys  
                   100                  105                  110  
 Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val  
           115                  120                  125  
 Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala  
           130                  135                  140  
 Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met Ser  
           145                  150                  155                  160  
 Arg Leu Gln Thr Met Gly Ile Arg Val Ala Lys Thr Tyr Glu Glu Glu  
                   165                  170                  175  
 Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys  
           180                  185                  190  
 Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Arg  
           195                  200

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 1697

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (6)..(1583)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 45

ttgaa atg gag tgt gtt gga gtt caa aat gtt gga gca atg gca gtt tta 50  
           Met Glu Cys Val Gly Val Gln Asn Val Gly Ala Met Ala Val Leu  
           1                  5                  10                  15  
 acg cgt ccg aga ttg aac cgt tgg tcg gga gga gag tta tgc caa gaa 98  
 Thr Arg Pro Arg Leu Asn Arg Trp Ser Gly Gly Glu Leu Cys Gln Glu  
                   20                  25                  30  
 aaa agc atc ttt ttg gcg tat gag cag tat gaa agt aaa tgt aat agc 146  
 Lys Ser Ile Phe Leu Ala Tyr Glu Gln Tyr Glu Ser Lys Cys Asn Ser  
           35                  40                  45  
 agt agt ggt agt gac agt tgt gta gtt gat aaa gaa gat ttt gct gat 194  
 Ser Ser Gly Ser Asp Ser Cys Val Val Asp Lys Glu Asp Phe Ala Asp  
           50                  55                  60  
 gaa gaa gat tat ata aaa gcc ggt ggt tcg caa ctt gta ttt gtt caa 242  
 Glu Glu Asp Tyr Ile Lys Ala Gly Gly Ser Gln Leu Val Phe Val Gln  
           65                  70                  75



## 56

atg cag cag aaa aaa gat atg gat cag cag tct aag ctt tct gat gag	290
Met Gln Gln Lys Lys Asp Met Asp Gln Gln Ser Lys Leu Ser Asp Glu	
80 85 90 95	
tta cga caa ata tct gct gga caa acc gta ctg gat tta gtg gta atc	338
Leu Arg Gln Ile Ser Ala Gly Gln Thr Val Leu Asp Leu Val Val Ile	
100 105 110	
ggc tgt ggt cct gct ggt ctt gct ctt gcc gcg gag tca gct aaa ttg	386
Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu	
115 120 125	
ggg ttg aac gtg ggg ctc gtt ggg cct gat ctt cct ttc aca aac aac	434
Gly Leu Asn Val Gly Leu Val Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn	
130 135 140	
tat ggt gta tgg gag gac gag ttc aaa gat ctt ggt ctt caa gcc tgc	482
Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys	
145 150 155	
att gaa cat gtt tgg cgg gat acc att gta tat ctt gat gat gat gaa	530
Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Glu	
160 165 170 175	
cct att ctt att ggc cgt gcc tat gga aga gtt agt cgc cat ttt ctg	578
Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Phe Leu	
180 185 190	
cac gag gag tta ctc aaa agg tgt gtg gag gca ggt gtt ttg tat cta	626
His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu	
195 200 205	
aac tcg aaa gtg gat agg att gtt gag gcc aca aat ggc cag agt ctt	674
Asn Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly Gln Ser Leu	
210 215 220	
gta gag tgc gaa ggt gat gtt gtg att ccc tgc agg ttt gtg act gtt	722
Val Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val	
225 230 235	
gca tcg ggg gca gcc tcg ggg aaa ttc ttg cag tat gag ttg gga agt	770
Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Ser	
240 245 250 255	
cct aga gtt tct gtt caa aca gct tat gga gtg gaa gtt gag gtt gat	818
Pro Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp	
260 265 270	
aac aat cca ttt gac ccg agc ctg atg gtt ttc atg gat tat aga gat	866
Asn Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp	
275 280 285	
tat ctc aga cac gac gct caa tct tta gaa gct aaa tat cca aca ttt	914
Tyr Leu Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe	
290 295 300	
ctt tat gcc atg ccc atg tct cca aca cga gtc ttt ttc gag gaa act	962
Leu Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr	
305 310 315	
tgt ttg gct tca aaa gat gca atg cca ttc gat ctg tta aag aaa aaa	1010
Cys Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys	
320 325 330 335	
ctg atg cta cga ttg aac acc ctt ggt gta aga att aaa gaa att tac	1058
Leu Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr	
340 345 350	

## 57

gag gag gaa tgg tct tac ata ccg gtt ggt gga tct ttg cca aat aca 1106  
Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr  
355 360 365

gaa caa aaa aca ctt gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtt cat cca 1154  
Glu Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro  
370 375 380

gcc aca ggt tat tca gtc gtc aga tca ctt tct gaa gct cca aaa tgc 1202  
Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys  
385 390 395

gcc tct gta ctt gca aat ata tta cga caa cat tat agc aag aac atg 1250  
Ala Ser Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln His Tyr Ser Lys Asn Met  
400 405 410 415

ctt acc agt tca agt atc ccg agt ata tca act caa gct tgg aac act 1298  
Leu Thr Ser Ser Ser Ile Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr  
420 425 430

ctt tgg cca caa gaa cga aaa cga caa aga tcg ttt ttc cta ttt gga 1346  
Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly  
435 440 445

ctg gct ctg ata ttg cag ctg gat att gag ggg ata agg tca ttt ttc 1394  
Leu Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe  
450 455 460

cgc gca ttc ttc cgt gtg cca aaa tgg atg tgg cag gga ttt ctt ggt 1442  
Arg Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly  
465 470 475

tca agt ctt tct tca gca gac ctc atg tta ttt gcc ttc tac atg ttt 1490  
Ser Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe  
480 485 490 495

att att gca cca aat gac atg aga aaa ggc ttg atc aga cat ctt tta 1538  
Ile Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Lys Gly Leu Ile Arg His Leu Leu  
500 505 510

tct gat cct act ggt gca aca ttg ata aga act tat ctt aca ttt 1583  
Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
515 520 525

tagagtaaac tcctcctaca ataattgttg aatcagagggc ctcattactt cagattcata 1643

acagaaatcg cggctctctcg aggcattgta tataacattt tcactagctt aata 1697

<210> 46  
<211> 526  
<212> PRT  
<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 46  
Met Glu Cys Val Gly Val Gln Asn Val Gly Ala Met Ala Val Leu Thr  
1 5 10 15  
Arg Pro Arg Leu Asn Arg Trp Ser Gly Gly Glu Leu Cys Gln Glu Lys  
20 25 30  
Ser Ile Phe Leu Ala Tyr Glu Gln Tyr Glu Ser Lys Cys Asn Ser Ser  
35 40 45  
Ser Gly Ser Asp Ser Cys Val Val Asp Lys Glu Asp Phe Ala Asp Glu  
50 55 60  
Glu Asp Tyr Ile Lys Ala Gly Gly Ser Gln Leu Val Phe Val Gln Met  
65 70 75 80

58

Gln Gln Lys Lys Asp Met Asp Gln Gln Ser Lys Leu Ser Asp Glu Leu  
 85 90 95  
 Arg Gln Ile Ser Ala Gly Gln Thr Val Leu Asp Leu Val Val Ile Gly  
 100 105 110  
 Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly  
 115 120 125  
 Leu Asn Val Gly Leu Val Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr  
 130 135 140  
 Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys Ile  
 145 150 155 160  
 Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Glu Pro  
 165 170 175  
 Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Phe Leu His  
 180 185 190  
 Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu Asn  
 195 200 205  
 Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly Gln Ser Leu Val  
 210 215 220  
 Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val Ala  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Ser Pro  
 245 250 255  
 Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp Asn  
 260 265 270  
 Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr  
 275 280 285  
 Leu Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu  
 290 295 300  
 Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu  
 325 330 335  
 Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr Glu  
 340 345 350  
 Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu  
 355 360 365  
 Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala  
 370 375 380  
 Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln His Tyr Ser Lys Asn Met Leu  
 405 410 415  
 Thr Ser Ser Ser Ile Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr Leu  
 420 425 430  
 Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu  
 435 440 445  
 Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg  
 450 455 460

## 59

Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser  
465 470 475 480  
Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile  
485 490 495  
Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Lys Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser  
500 505 510  
Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
515 520 525

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 510

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(510)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase specific probe

&lt;400&gt; 47

ggcacgagggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60  
gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120  
agaatcatta ctaacaatca atgagtatga gagctggaca catgacggca acaatggcgg 180  
cttttacatg ccctagggtt atgactagca tcagatacac gaagcaaatt aagtgcacg 240  
ctgctaaaag ccagctagtc gttaaacaag agattgagga ggaagaagat tatgtgaaag 300  
ccggtggatc ggagctgctt tttgttcaaa tgcaacagaa taagtccatg gatgcacagt 360  
ctagcctatc ccaaaagctc ccaagggtac caataggagg aggaggagac agtaactgta 420  
tactggattt gggttgaatt gggtgtggtc ctgctggcct tgctcttgct ggagaatcag 480  
ccaagctagg cttgaatgtc gcacttatcg 510

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 48

ggcacgagggc aaagcaaagg

20

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 49

cgataagtgc gacattcaag c

21

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 734

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

60

&lt;222&gt; (1)..(734)

<223> fragment of epsilon cyclase gene obtain by iPCR  
comprising part of promoter region

&lt;400&gt; 50

```
ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120
cagctagtctg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cgggtggatcg 180
gagctgcttt ttgttcaa atgcaacagaat aagtcacatg atgcacagtc tagcctatcc 240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300
gatatttaga tagattagct atcacctgtg ctgtggtgtg cagctcccaa gggctcttacc 360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggaggtg ggggattata ggctttgttg 420
tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaaat cgggtgttga atgagggtta atggagtta 480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga ggggtgatgg gatattaaag acggscaata 540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa 720
acagatacaa ggcg 734
```

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 280

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(280)

<223> fragment of epsilon cyclase gene obtain by  
TAIL-PCR comprising part of promoter region

&lt;400&gt; 51

```
gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat 60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaac acatacaacg 120
tggcttttaa agatggcttg gctgctaact aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttggtgt 240
tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280
```

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 52

cgccttgtat ctgtttggat tgg

23

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 53

ctaacaatca atgagtatga gagc

24

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

61

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 54

agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 55

ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 56

tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 57

gtcgagtatg gagtt

15

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 734

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(734)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase genomic iPCR-fragment

&lt;400&gt; 58

ctaacaatca	atgagtagag	agctggacac	atgacggcaa	caatggcggc	ttttacatgc	60
cctaggttta	tgactagcat	cagatacacg	aagcaaatta	agtgcacgc	tgctaaaagc	120
cagctagtcg	ttaaacaaga	gattgaggag	gaagaagatt	atgtgaaagc	cgggtggatcg	180
gagctgcttt	ttgttcaaat	gcaacagaat	aagtccatgg	atgcacagtc	tagcctatcc	240
caaaagggtca	ctccagactt	aattgcttat	aaataaataa	atatgttttt	taggaataat	300
gatatttaga	tagattagct	atcacctgtg	ctgtgggtgtg	cagctcccaa	gggtcttacc	360
gatagtaaaa	tcgttagtta	tgattaatac	ttggggagggtg	ggggattata	ggctttgttg	420
tgagaatggt	gagaaagagg	tttgacaaat	cgggtgtttga	atgaggttta	atggagttaa	480
attaaaataa	agagaagaga	aagattaaga	gggtgatggg	gatattaaag	acggscaata	540
tagtgatgcc	acgtagaaaa	aggtaagtga	aaacatacaa	cgtggcttta	aaagatggct	600
tggctgctaa	tcaactcaac	tcaactcata	tcctatccat	tcaaattcaa	ttcaattcta	660

## 62

ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa 720  
acagatacaa ggcg 734

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 59

ctcgagagta aaatcgtttag ttatg

25

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 60

ccatggccat tgattggttag taatgattc

29

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 61

ccatggtaat ttgcttcgtg tatctgatg

29

<210> 62

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 62

ccatggcgct agcagcgaca gtaatg

26

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 63

gatatccggt gtgagggaac tag

23

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 64

gcaagctcga cagctacaaa cc

22

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 65

gaagcatgca gctagcagcg acag

24

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 1795

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for  
ketolase - 35S terminator construct

&lt;400&gt; 66

ccatggcgct	agcagcgaca	gtaatgttgg	agcagcttac	cggaagcgct	gaggcactca	60
aggagaagga	gaaggagggt	gcaggcagct	ctgacgtggt	gcgtacatgg	gcgacccagt	120
actcgcttcc	gtcagaggag	tcagacgcgg	cccgcgcggg	actgaagaat	gcctacaagc	180
caccaccttc	cgacacaaaag	ggcatcacaa	tggcgctagc	tgctcatcggc	tcctggggccg	240
cagtgttcc	ccacgccatt	tttcaaatca	agcttccgac	ctccttggac	cagctgcact	300
ggctgcccgt	gtcagatgcc	acagctcagc	tgggttagcgg	cagcagcagc	ctgctgcaca	360
tcgtcgtagt	attctttgtc	ctggagttcc	tgtacacagg	cctttttatc	accacgcatg	420
atgctatgca	tggcaccatc	gccatgagaa	acaggcagct	taatgacttc	ttggggcagag	480
tatgcatctc	cttgtagcgc	tggtttgatt	acaacatgct	gcaccgcaag	cattggggagc	540
accacaacca	cactggcgag	gtgggcaagg	accctgactt	ccacagggga	aaccctggca	600
ttgtgcccctg	gtttgccagc	ttcatgtcca	gctacatgtc	gatgtggcag	tttgccgcgcc	660
tcgcatgggtg	gacggtggtc	atgcagctgc	tgggtgccc	aatggcgaa	ctgctggtgt	720
tcattggcggc	cgcgcccatc	ctgtccgcct	tccgcttggt	ctactttggc	acgtacatgc	780
cccacaagcc	tgagcctggc	gccgcgtcag	gctcttcacc	agccgtcatg	aactggtgga	840
agtgcgcac	tagccaggcg	tccgacctgg	tcagctttct	gacctgctac	cacttcgacc	900
tgcactggga	gcaccaccgc	tggccctttg	ccccctgggtg	ggagctgccc	aactgccgcc	960
gcctgtcttg	ccgaggtctg	gttcctgcct	agctggacac	actgcagtgg	gccctgctgc	1020
cagctgggca	tgcctgcagg	tcgacggatc	cccggaatt	cggtacgctg	aatcaccag	1080
tctctctcta	caaactatc	tctctctatt	ttctccataa	ataatgtgtg	agtagtttcc	1140
cgataaggga	aattagggtt	cttatagggt	ttcgctcatg	tgttgagcat	ataagaaacc	1200
cttagtatgt	atttgattt	gtaaaatact	tctatcaata	aaatttctaa	ttcctaaaac	1260
caaaatccag	tactaaaatc	cagatctcct	aaagtcccta	tagatctttg	tcgtgaatat	1320
aaaccagaca	cgagacgact	aaacctggag	cccagacgcc	gttcgaagct	agaagtaccg	1380
cttaggcagg	aggccgttag	ggaaaagatg	ctaaggcagg	gttggttacg	ttgactcccc	1440
cgtaggtttg	gtttaaatat	gatgaagtgg	acggaaggaa	ggaggaagac	aaggaaggat	1500
aaggttgcag	gccctgtgca	aggtaagaag	atggaaattt	gatagaggta	cgctactata	1560
cttatactat	acgctaaggg	aatgcttgta	tttataccct	atacccccta	ataaccctt	1620
atcaatttaa	gaaataatcc	gcataagccc	ccgcttaaaa	attggtatca	gagccatgaa	1680
taggtctatg	acaaaactc	aagaggataa	aacctcacca	aaatacgaaa	gagttcttaa	1740
ctctaaagat	aaaagatctt	tcaagatcaa	aactagtctc	ctcacaccgg	atatc	1795

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 28



<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 67  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28  
<210> 68  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 68  
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37  
<210> 69  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 69  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34  
<210> 70  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 70  
taagcttttt gttgaagaga tttgg 25  
<210> 71  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 71  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc 28  
<210> 72  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 72  
ggatccggtg atacctgcac atcaac 26

<210> 73  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 73  
aagcttaccg atagtaaaat cgtaggtt 28

<210> 74  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 74  
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t 31

<210> 75  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 75  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc 28

<210> 76  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 76  
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc 28

<210> 77  
<211> 777  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(777)  
<223> modified version of the AP3 promoter

<400> 77  
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60  
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga 120  
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180  
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240

66

```
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaagggc aaatccggga aattattgta 300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360
tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgc 480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600
tcacttagtt ttcacatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaatc tcttcaacaa aaagctt 777
```

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; intron

&lt;222&gt; (1)..(212)

&lt;223&gt; PIV2 intron of ST-LS1 gene

&lt;400&gt; 78

```
gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60
gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata actttttctaa tatatgacca 180
aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212
```

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(358)

<223> coding for sense-strand of epsilon cyclase  
promoter directed dsRNA

&lt;400&gt; 79

```
aagcttaccg atagtaaaat cgttagttat gattaataact tgggaggtgg gggattatag 60
gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgaggttaaa 120
tggagtttaa ttaaaataaaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
cggccaatat agtgatgcc aactgaaaaa ggtaagtga aacatacaac atggcttttaa 240
aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
tcaattctat tgaatgcaaa gcaagcaaaa gcaaggttg tttgttgttg ttgtcgac 358
```

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 361

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(361)

<223> coding for antisense-strand of epsilon cyclase  
promoter directed dsRNA

&lt;400&gt; 80

```
ctcgagctta ccgatatgaa aatcgttagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60
taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgagggt 120
aaatggagtt taattaaaaa aaagagaaga gaaagattaa gagggatgat gggatatata 180
agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggttaagt gaaaacatac aacgtggctt 240
taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tatcctatcc attcaaattc 300
aattcaattc tattgaatgc aaagcaaaagc aaagcaaaagc ttgtttgttg ttgttgatc 360
```

c

361

67

<210> 81  
<211> 1537  
<212> DNA  
<213> Cucumis sativus  
  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(1537)  
<223> promoter of chromoplast-specific  
carotenoid-associated protein (CHRC)

<400> 81  
gagctctaca aattagggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60  
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcaatttct tattcatacc 120  
tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180  
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc 240  
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300  
aatacaaaata aagtgaacaa aaatatctat aaataaacia atatataat tttgtagac 360  
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420  
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480  
taaaccctat ttaaataagct aactataaga tctttaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600  
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtc taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660  
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattt aataaaaaag actaataaat 720  
atataaaatg aatgttcata cgcagaccca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
cacaacccaa ttctattttc gttccttggg ggctgggttt ctcaaggt tcaatagtca 1020  
atattagggt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080  
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcgggtg gctcgtttta 1200  
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccca tgccacgtgt tctgagctta 1260  
acaagccacg ttgctgtcca ttgccaaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
acctccaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgogaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
taaaacgtag ctgctgttta agtaaattccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

<210> 82  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

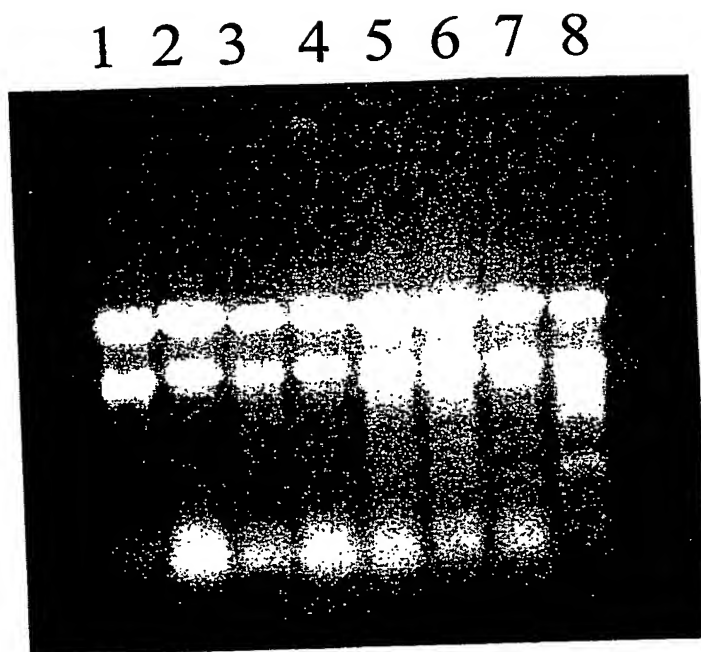
<400> 82  
gagctctaca aattagggtt ac 22

<210> 83  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 83  
aagcttatta tttccaaatt ccg 23

A



B

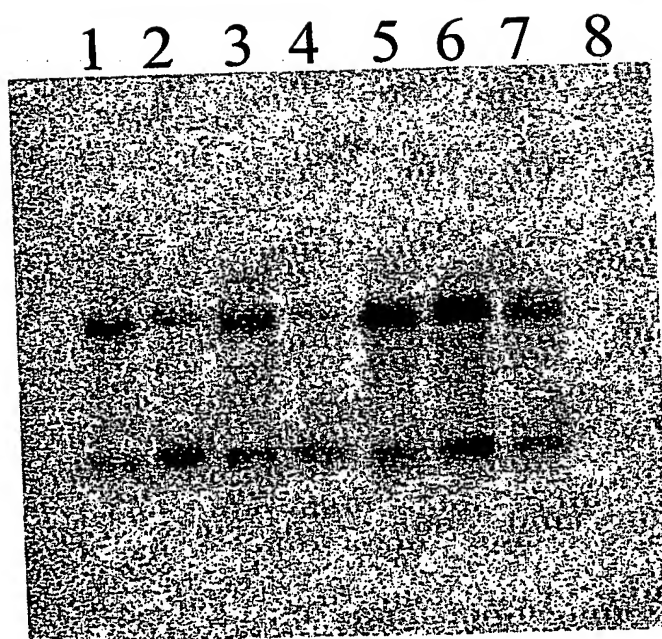


Fig.1

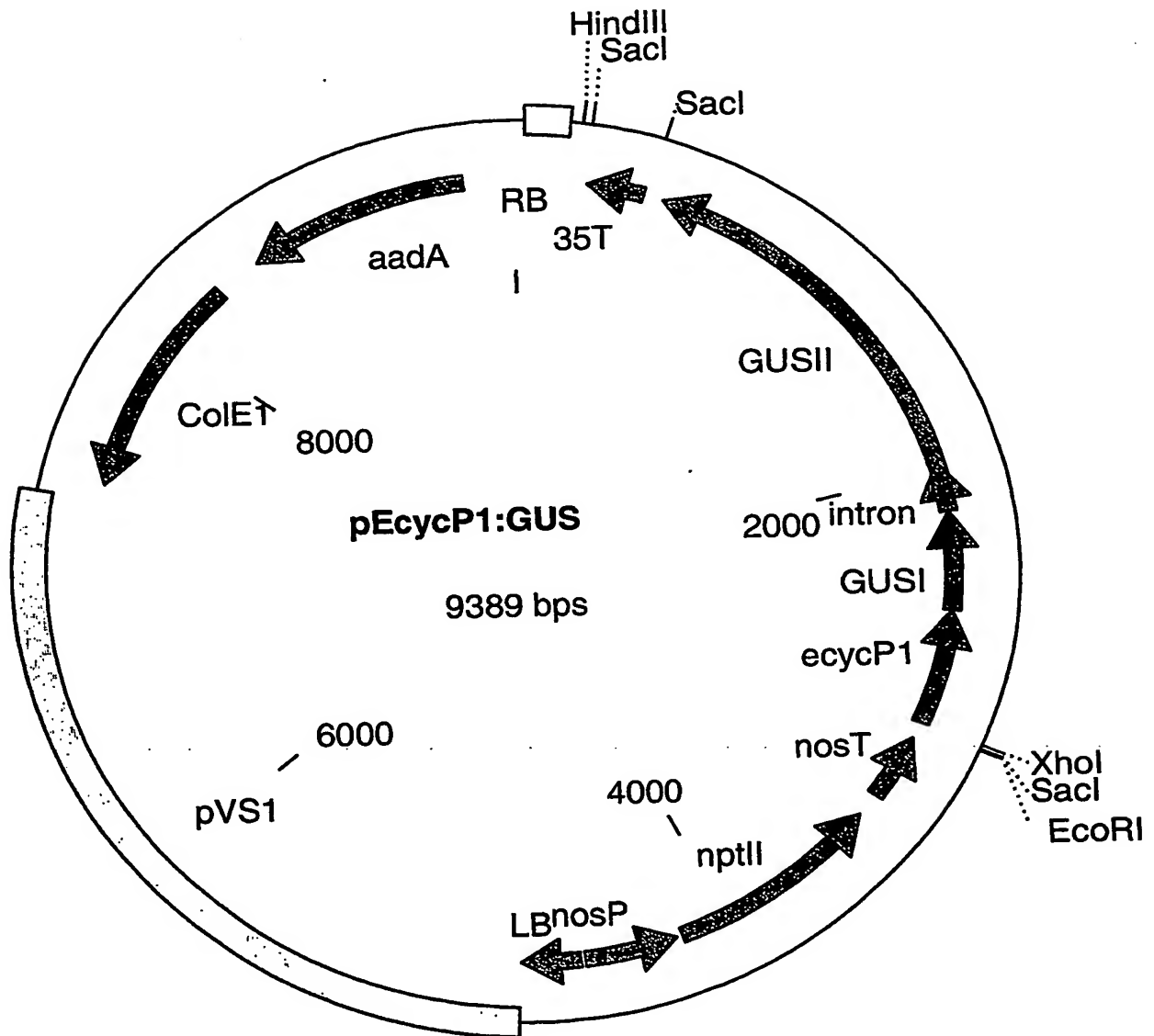


Fig.2

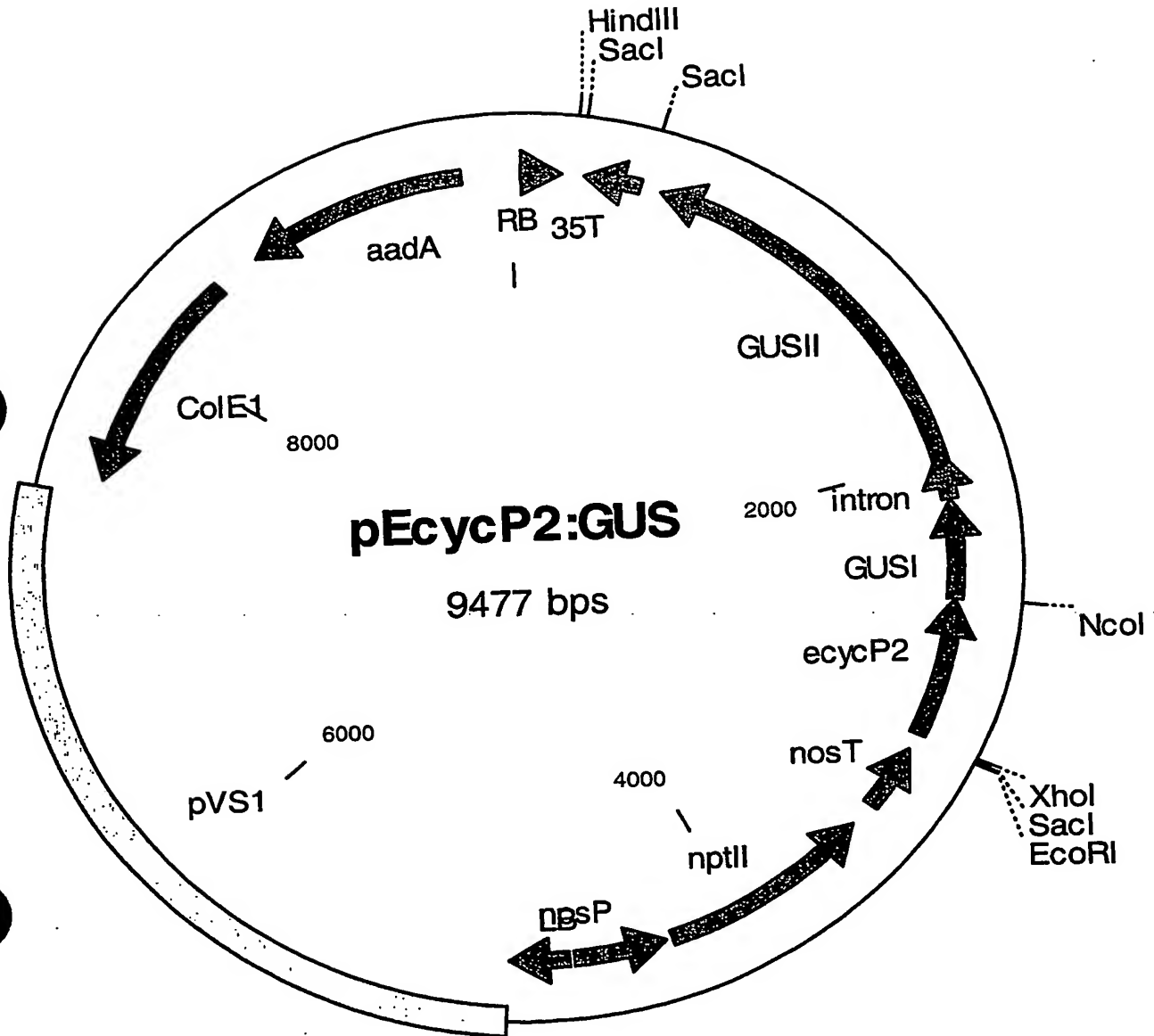


Fig.3

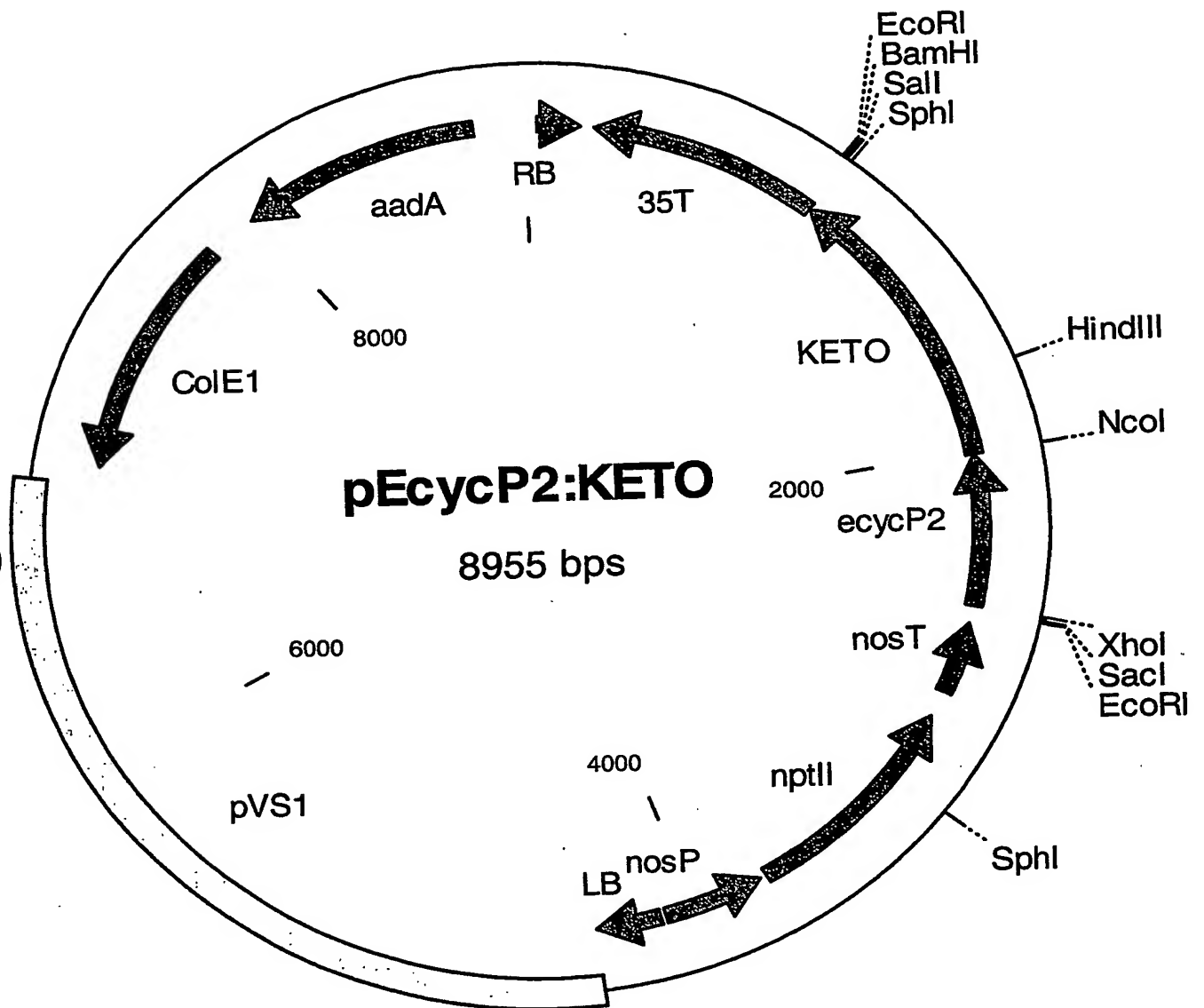


Fig.4



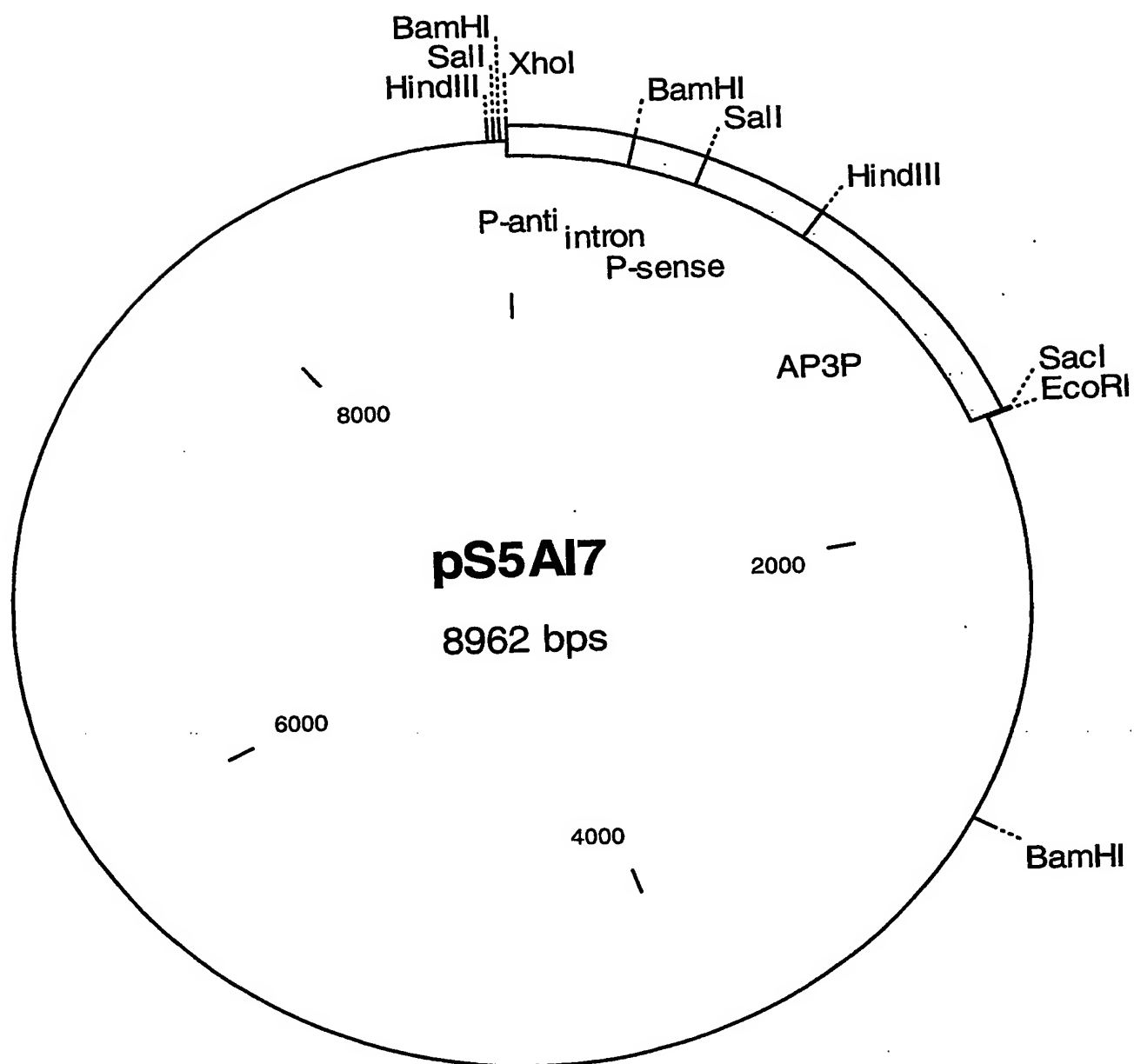


Fig.5

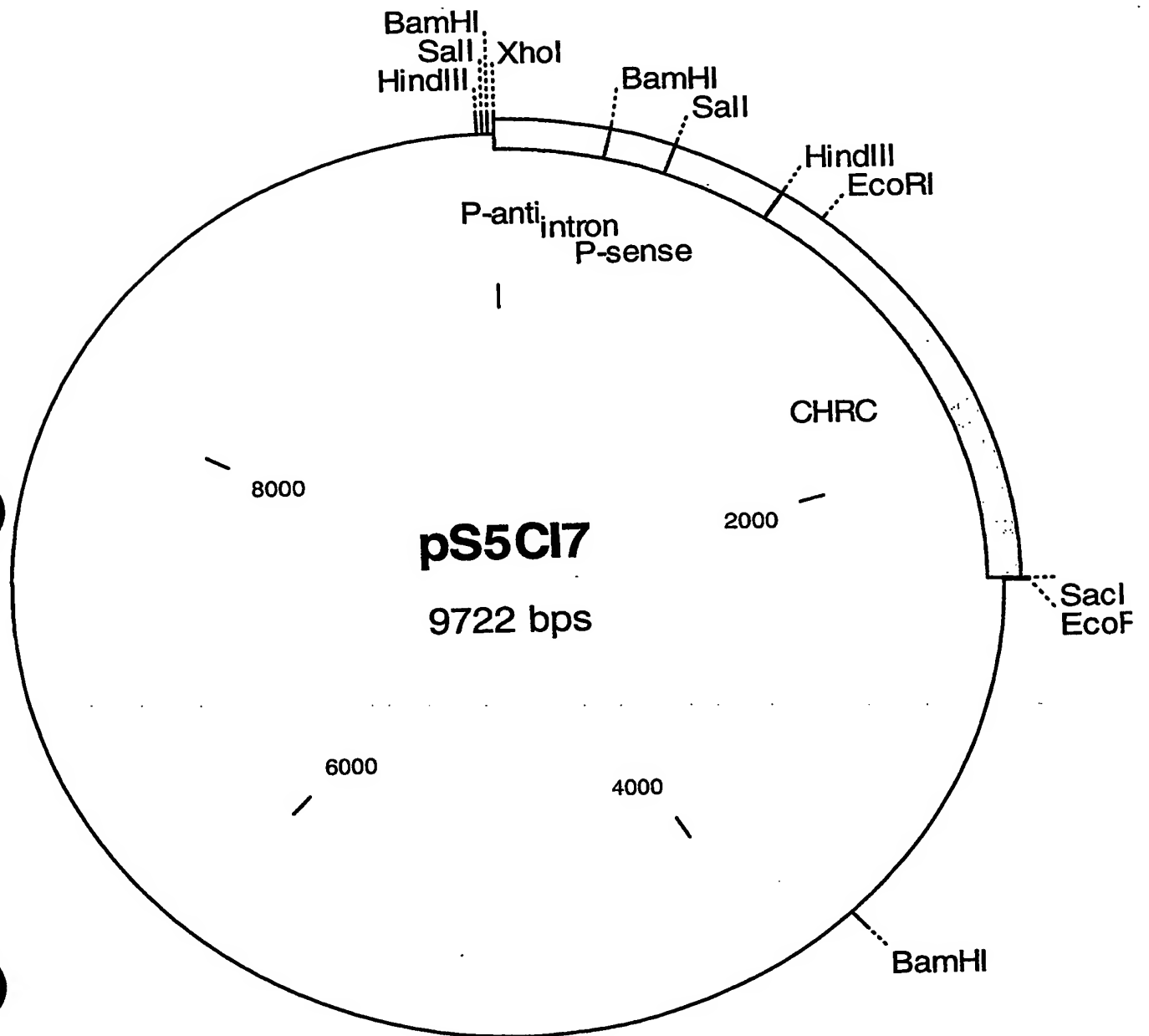


Fig.6

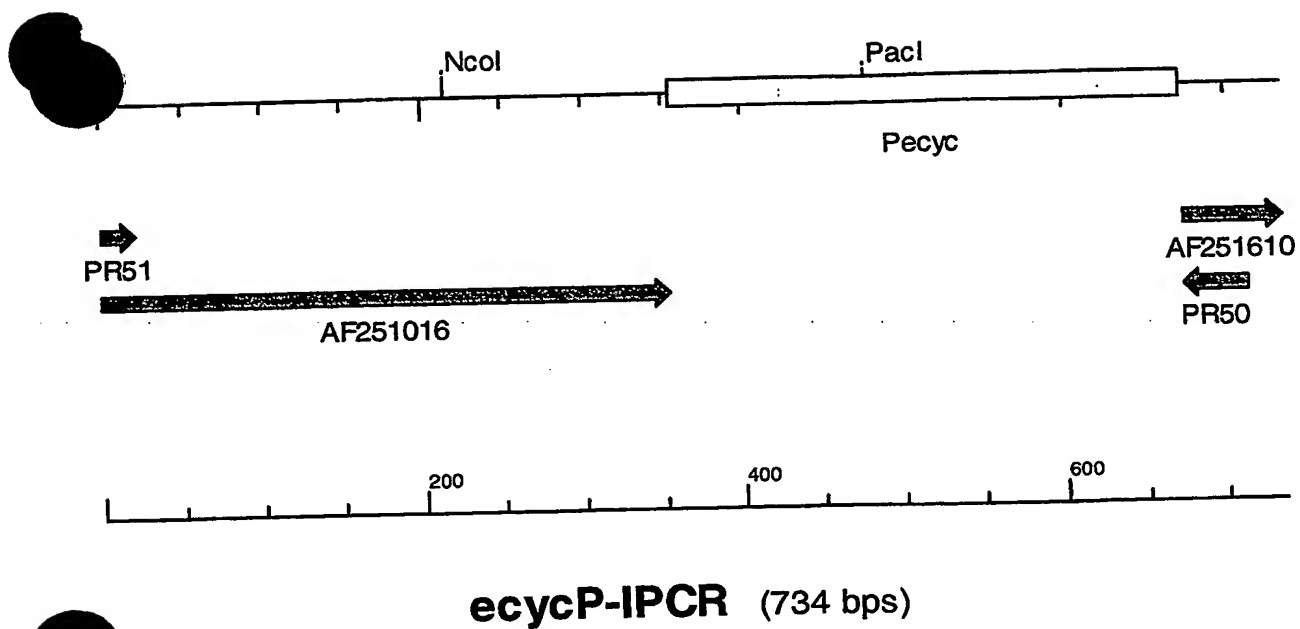


Fig.7

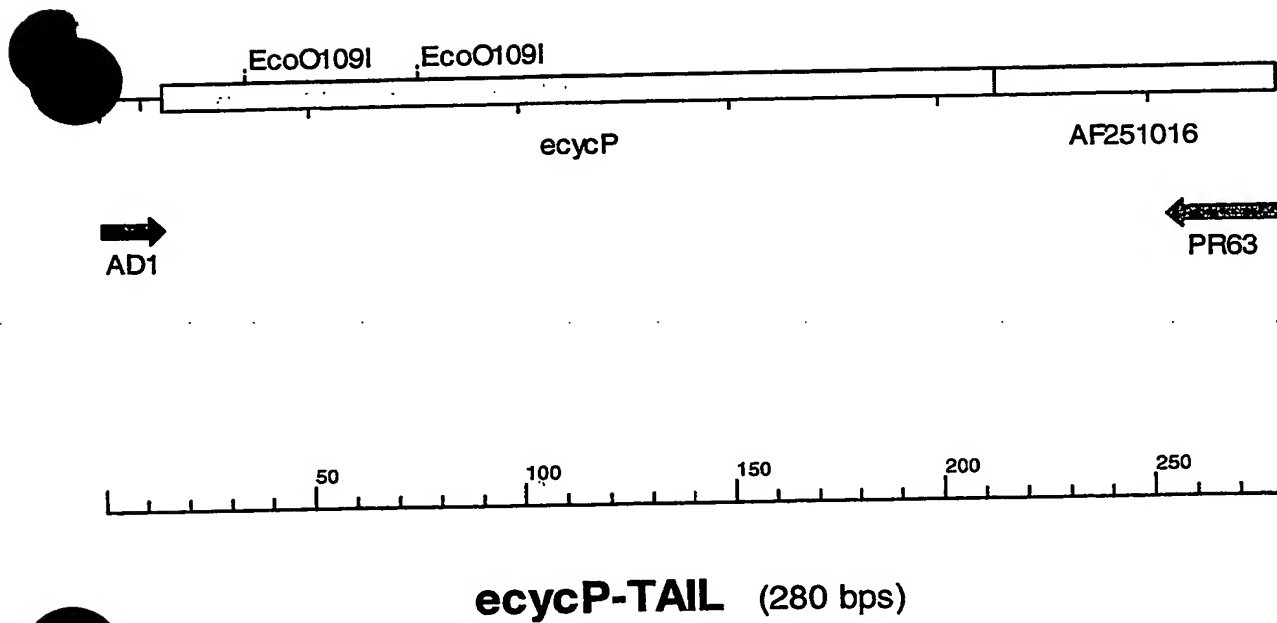


Fig.8

KETO2. seq ATGCAGCTACGACGACAGTAATGTTCTACAGAGCTTACCGGAAGGCTGAGGCACATCAAGTGGAGAACGAGGTTGCAGGCAGCTCTGAGGIGTTGC 100  
X86782. seq ATGCAGCTACGACGACAGTAATGTTGGAGAGCTTACCGGAAGGCTGAGGCACATCAAGGAGAGAGGAGAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGAGGIGTTGC 100

KETO2. seq GTACATGGGGACCCAGTACTGCGCTTCGGTCAGAGAGTACAGCGGGGGGGGGGGGGGACCTGAAGAATGCTACAGCCACCACTTCCGACACAAAGGG 200  
X86782. seq GTACATGGGGACCCAGTACTGCGCTTCGGTCAGAGAGTACAGCGGGGGGGGGGGGGGACCTGAAGAATGCTACAGCCACCACTTCCGACACAAAGGG 200

KETO2. seq CATCACAATGGGCTAGCTGTGATGCGCTCCGGCGGAGTGTCTCCAGCCCATTTTCAAAATCAAGCTTCGGACCTCTCTGGACAGCTGCACCTGG 300  
X86782. seq CATCACAATGGGCTAGCTGTGATGCGCTCCGGCGGAGTGTCTCCAGCCCATTTTCAAAATCAAGCTTCGGACCTCTCTGGACAGCTGCACCTGG 300

KETO2. seq CTGCGCGGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTACCGCCAGCAGAGCGCTGCTGCACATGCTGTGAGTATTTCTTTGTCCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 400  
X86782. seq CTGCGCGGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTACCGCCAGCAGAGCGCTGCTGCACATGCTGTGAGTATTTCTTTGTCCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 400

KETO2. seq TTTTATACCAACCATGATGCTATGCATGCCACCATGCCATGAGAAACAGGACGCTTATGACTTCTTGGCCAGAGTATGCATCTCTCTGTACGCGCTG 500  
X86782. seq TTTTATACCAACCATGATGCTATGCATGCCACCATGCCATGAGAAACAGGACGCTTATGACTTCTTGGCCAGAGTATGCATCTCTCTGTACGCGCTG 500

KETO2. seq GTTTGATTACAAACATGCTGCAACCCAGCATTTGGGAGCACCAACACACTGGGAGGTGGCAAGGACCTGACTTCCACAGGGGAAACCTTGGCATT 600  
X86782. seq GTTTGATTACAAACATGCTGCAACCCAGCATTTGGGAGCACCAACACACTGGGAGGTGGCAAGGACCTGACTTCCACAGGGGAAACCTTGGCATT 600

KETO2. seq GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCCCATGTTGGACGGTGTGTCATGCCAGCTCTGGGTCGCGCAA 700  
X86782. seq GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCCCATGTTGGACGGTGTGTCATGCCAGCTCTGGGTCGCGCAA 700

KETO2. seq TGGCGAACCTGCTGTGTTCATGGCGCGCGCGCGCGCATCCGTGTCGCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCCCCACAAAGCCTGAGCCTGGCGC 800  
X86782. seq TGGCGAACCTGCTGTGTTCATGGCGCGCGCGCGCGCATCCGTGTCGCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCCCCACAAAGCCTGAGCCTGGCGC 800

KETO2. seq CCGGTGAGGCTCTTCACCAAGCGGTGATGAACTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGCGGTCCGACCTGTGACCTTCTGACCTGCTACCACITCGACCTG 900  
X86782. seq CCGGTGAGGCTCTTCACCAAGCGGTGATGAACTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGCGGTCCGACCTGTGACCTTCTGACCTGCTACCACITCGACCTG 900

KETO2. seq CACTGGGAGCAACCAACGCTGGGCGCTTTGGCGGCTGGGAGCTGGGCACTGGGCGGAGGTCTGGTTCCTGCTAG 990  
X86782. seq CACTGGGAGCAACCAACGCTGGGCGCTTTGGCGGCTGGGAGCTGGGCACTGGGCGGAGGTCTGGTTCCTGCTAG 990

Fig.9

KETO2.pro	MQL A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A	50
X86782.pro	MQL A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A	50
KETO2.pro	R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W	100
X86782.pro	R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W	100
KETO2.pro	L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N	150
X86782.pro	L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N	150
KETO2.pro	R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I	200
X86782.pro	R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I	200
KETO2.pro	V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F	250
X86782.pro	V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F	250
KETO2.pro	R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L	300
X86782.pro	R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L	300
KETO2.pro	H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A	329
X86782.pro	H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A	329

Fig.10

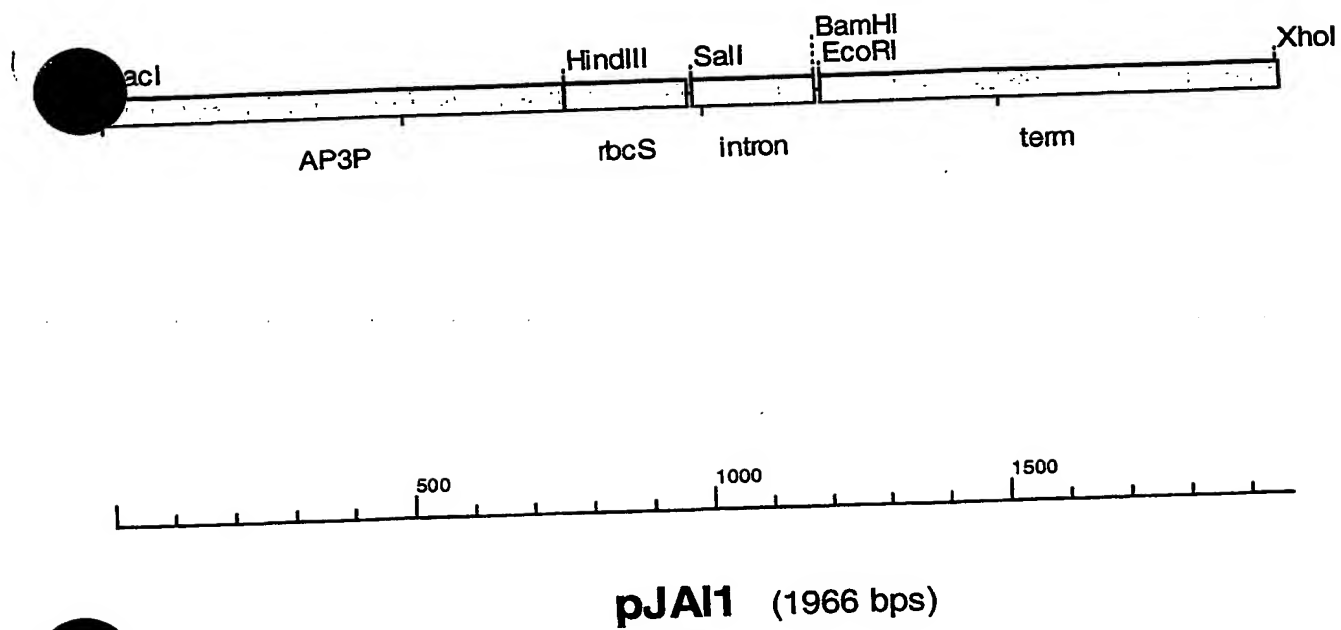


Fig.11

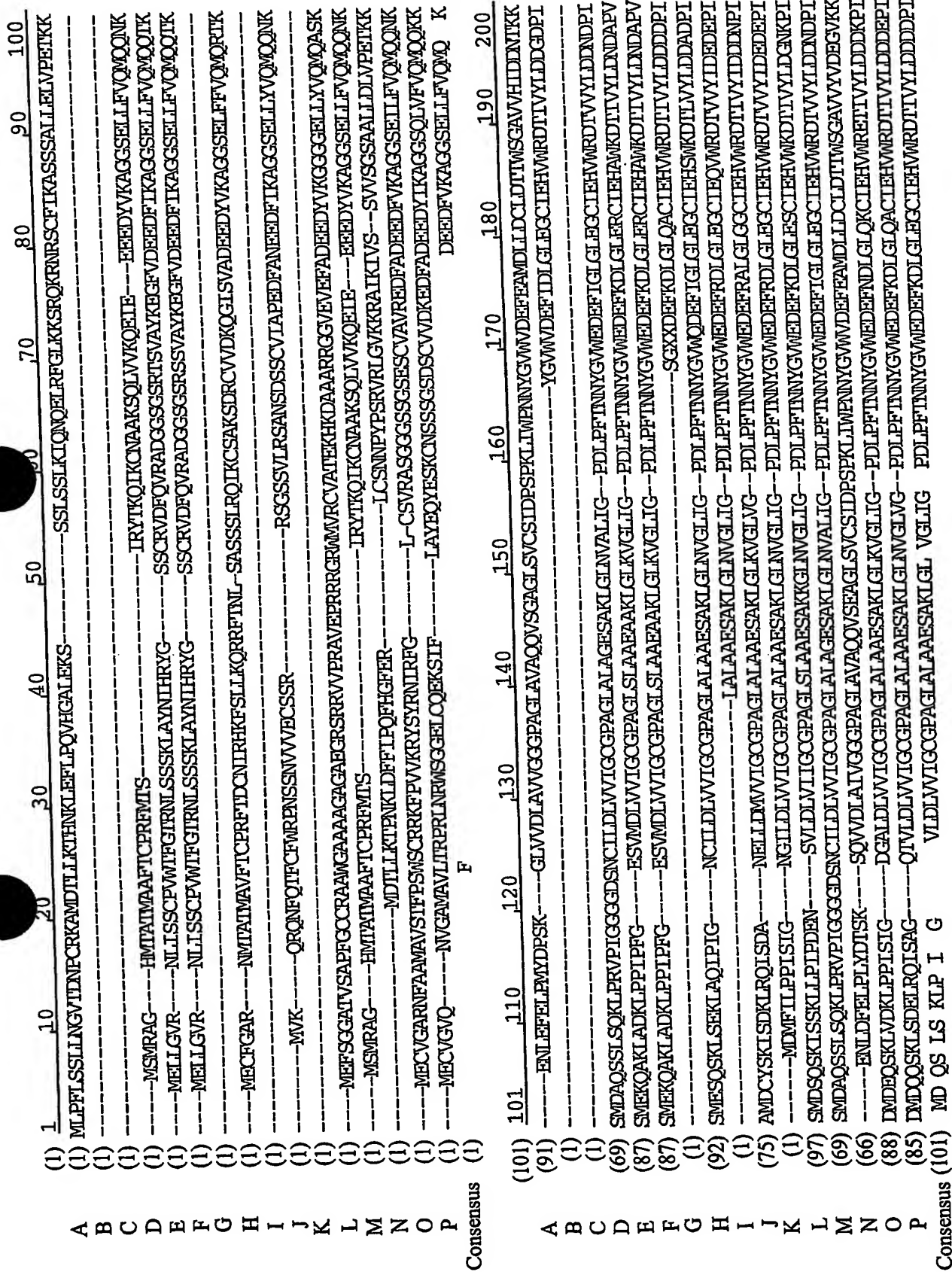


Fig.12A



(201) 201 210 230 240 250 270 280 290 300  
 (182) DLNRPYGRVNRKLLKSKMLQKCTINGVKFHQAKVTKVTHHE-SKSLICNDGVTIQAADATGFSRCLNVQDKPNP--GYQVAYGILAEVEQHFFDL  
 (35) MIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVEKLTIEAGDCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYEVGGPRVSVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (1) -IGRAYGRVVAICFWKNCIKGVSSQVFRLLAQKLKRLKLEWATAMLSVKIILSFHAGLLIHLHQLLGNFCSMGLGVPEFLSKQLMWSRIRWKPPIPYD  
 (167) LIGRAYGRVSRDILLHEELLTROMESGVSYLSKSKVERITTEAPNGLSLTIECEGNITIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (180) LIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAGDCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYEVGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (180) LIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAGDCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (34) LIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVEAGVLYNSKVDRIVEATNGCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (185) RIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAPNGVSLTIECEGNITIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (61) LIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAGDCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (168) YIGRSYGKVSRLHHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAGDCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (88) LIGRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAGDCHSLVCEENNIVIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (190) MIGRAYGRVSRDILLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITTEAPNGLSLTIECEGNITIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (167) LIGRAYGRVSRDILLHEELLTROMESGVSYLSKSKVERITTEAPNGLSLTIECEGNITIPCLATVASGAASCKLLQYELGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (157) DLSRPYGRVNRKQLKSKMLQKCTINGVKFHQAKVTKVTHHEE-ANSTVCSGDKIQASVLDATGFSRCLNVQDKPNP--GYQVAYGILAEVDGHPFDV  
 (181) TICRAYGRVSRHLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVDSTIEASDGLRLVACDNNVIPCRLATVASGAASCKLLQYEVGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (178) LICRAYGRVSRHFLHEELLKRCVEAGVLYNSKVDRIVEATNGQSLVECEGNIVIPCRFVIVASGAASCKLLQYELGSRVSVQIYAYGVVEVENNPPYD  
 (201) LICRAYGRVSRLLHEELLKRCVESGVSYLSKSKVERITEA GHSLV CE I IPCRLATVASGAASCKLL YEVGGPRVCVQIYAYGVVEVENNPPYD

Consensus

(301) 301 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 (279) DKWFMDNRDSDHANNNSQLKEANSKIPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAPGVEMKDIQERWVARLKLHGLIKVKSTEED---EHCVIWGGFLP  
 (135) SLWFMDYRDYTKQVPGME---AEYPTFLYAMP  
 (100) SLWFMDYRDYTKQVPGME---AEYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (267) SLWFMDYRDYTKHKSQSL---AQYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (280) NLWFMDYRDYVWQKLQCSE---EEYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (280) NLWFMDYRDYVWQKLQCSE---EEYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (134) SLWFMDYRDYVVRHDAQSL---AKYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (285) DLWFMDYRDYVVRHDAQSL---AKYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (161) SLWFMDYRDYTKQVPSFE---SINPFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (268) NVWFMDYRDYTKLSVQSL---AKYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (188) SLWFMDYRDYTKQVPSFE---SINPFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (290) SLWFMDYRDYTKHKSQSL---AQYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (267) SLWFMDYRDYTKHKSQSL---AQYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (254) DKWFMDNRDSDHANNNSQLKEANSKIPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAPGVEMKDIQERWVARLKLHGLIKVKSTEED---EHCVIWGGFLP  
 (281) DQWFMDYRDYVVRHDAQSL---AEYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 (278) SLWFMDYRDYVVRHDAQSL---AKYPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLLQIMGIRVAKTYEE---EMSYIPVGGSLP  
 Consensus (301) SLWFMDYRDYTK VV SLE A YPTFLYAMPSPTRIFFEETICLASKDAMPFDLLKKKIMSRLL QIMGIRVAKTYEE

Fig.12B

(401) 401 410 430 440 450 470 480 490 500  
(370) VLPQVVGIGTAGWHPSTIGYMWARTLAAPTIVANIVRSLS--D-----RSISGTHSSAEVWKDLMPTERRRRQREFFCFQGMILLKLDLPAIRREF  
(166) -----  
(188) NTEQKNLAFGAAAR  
(355) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPNVAAVIAKILCKENSKQMLDHGRYTTN-ISKQAWETHLWPLEKKRQRAFFLFGALIVQMDIEGIRTEFF  
(368) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASVIAKILKQNSAYVVSQSSAVN-ISMQAWSSLMWPKERKQRAFFLFGLELIVQLDIEATRIEFF  
(368) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASVIAKILKQNSAYVVSQSSAVN-ISMQAWSSLMWPKERKQRAFFLFGLELIVQLDIEATRIEFF  
(368) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKCAFVLANILRQNHKSNMLTSS-STPS-ISTQAWNTHLWPEQKRQRSFFLFGALILQLDIEGIRSEFF  
(222) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPNVAAVIAKILRQDQSKEMISLGKTYN-ISKQAWETHLWPLEKKRQRAFFLFGLSHIVMLDIEGIRTEFF  
(373) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPNVAAVIAKILRQDQSKEMISLGKTYN-ISKQAWETHLWPLEKKRQRAFFLFGLSHIVMLDIEGIRTEFF  
(249) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASIAIANILKNDLSKNAILRQRSVEN-ISMQAWNTHLWPEQKRQRAFFLFGLSLIVQLDIEGIRTEFF  
(356) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPNVAASAIAYILKHDSHGRUTHEQSNEN-ISMQAWNTHLWPEQKRQRAFFLFGALILQLDIEGIRTEFF  
(276) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASVIAKILKQNSAYVVSQSSAVN-ISMQAWSSLMWPKERKQRAFFLFGLELIVQLDIEATRIEFF  
(378) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASVIAKILKQNSAYVVSQSSAVN-ISMQAWSSLMWPKERKQRAFFLFGLELIVQLDIEATRIEFF  
(364) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPNVAAVIAKILCKENSKQMLDLGRYTTN-ISKQAWETHLWPLEKKRQRAFFLFGALIVQMDIEGIRTEFF  
(345) VLPQVVGIGTAGWHPSTIGYMWARTLAAPTIVANIVRSLS--SS-----NSLRGQLSAEVWRDLWPEQKRQRAFFLFGALIVQMDIEGIRSEFF  
(369) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASVIAEILREETH-----KQINSN-ISRQAWNTHLWPEQKRQRAFFLFGALILQLDIEGIRSEFF  
(366) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAPKVASVIANILRQNHKSNMLTSS-SIPS-ISTQAWNTHLWPEQKRQRSFFLFGALILQLDIEGIRSEFF  
(401) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSLSSEAP YASVIA IIR S L IS QAW TLMPE ERKRQRAFFLFGALIVQLDIEGIRTEFF

(501) 501 510 520 530 540 550 563  
(462) DAFFDLPERYWHGFTSSRLFLPELIVFGLSLFSHASNTSRLEIMAKGTILPLANNMINLVQDID  
(166) -----  
(202) -----  
(454) RUFFRLPTMMWNGFTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGGIMLKAYLIT  
(467) RUFFRLPTMMWNGFTGSSLSSTDLVIFSMWMEVIAFNMSRMSLVRHLISDPSGAVMWKAYLER  
(467) RUFFRLPTMMWNGFTGSSLSSTDLVIFSMWMEVIAFNMSRMSLVRHLISDPSGAVMWKAYLER  
(320) RAFFRVPKMMWQGTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATILIRTYLIT  
(471) RUFFRLPKMMWNGFTGSSLSSTDLIIIFALYMFVIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATMWKAYLIT  
(263) -----  
(455) RUFFRVPKMMWNGFTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATMIRTYLIT  
(375) RUFFRLPKMMWNGFTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATMIRTYLIT  
(478) EIFFRLPKMMWNGFTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATMIRTYLIT  
(463) RUFFRLPTMMWNGFTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATMIRTYLIT  
(439) DAFFDLQPHYWHGFTSSRLFLPELIVFGLSLFSHASNTSRLEIMAKGTIVPLAKMINLVQDID  
(462) RUFFRLPKMMWQGTGSSLSSTDLVIFALYMFVIAFNMSRMSLVRHLISDPTGATMIRTYLIT  
(464) RAFFRVPKMMWQGTGSSLSSTDLIIIFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPTGATMIRTYLIT  
(501) RUFFRLP VMW GFLGSSLS DLILFA YMFIIAEN LRM LVRHLISDPTGATMIRTYLIT

Fig.12C

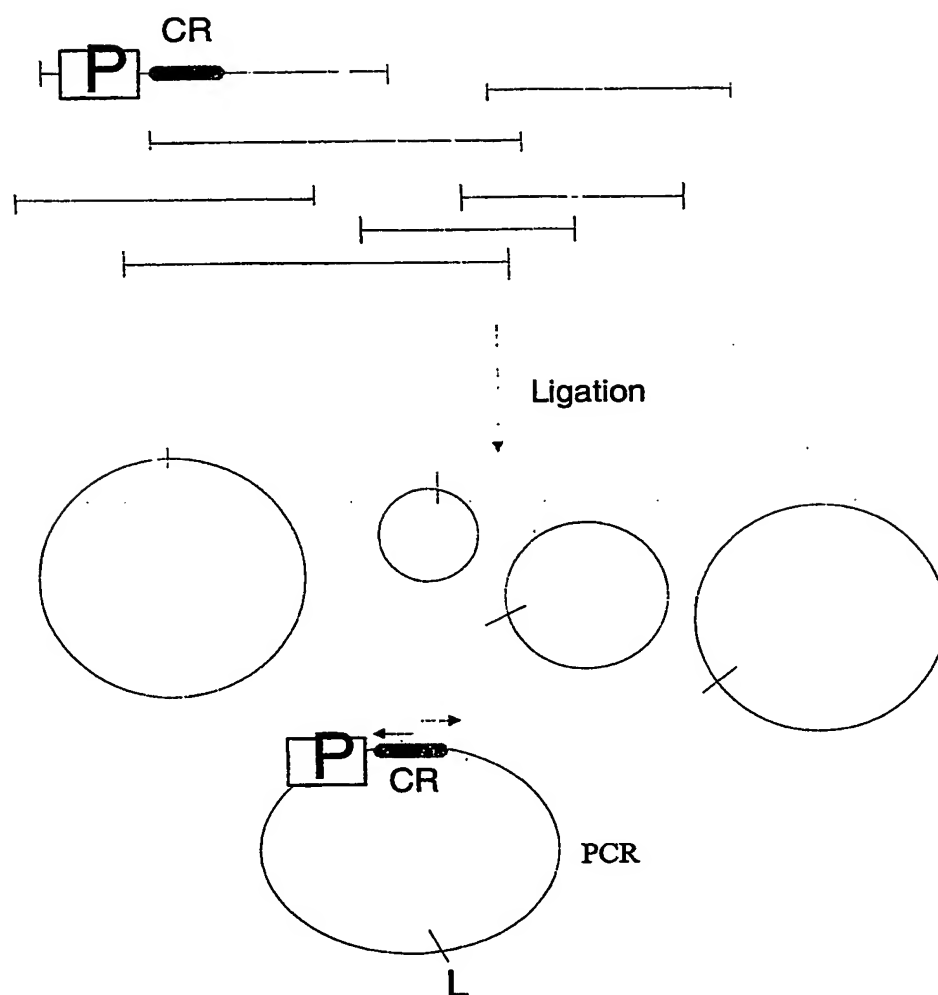


Fig. 13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**